
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(ZOOLOGIA)

O assoalhamento em *Bokermannohyla alvarengai* (Anura, Hylidae): história natural e adaptações morfo-fisiológicas

FERNANDA DA CRUZ CENTENO

Dissertação/tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Zoologia).

Outubro - 2014

FERNANDA DA CRUZ CENTENO

O assoalhamento em *Bokermannohyla alvarengai* (Anura, Hylidae): história natural e adaptações morfo-fisiológicas

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Zoologia).

Orientador: Denis Otávio Vieira de Andrade

Rio Claro

2014

597.8 Centeno, Fernanda da Cruz
C397a O assombramento em Bokermannohyla alvarengai (Anura,
Hylidae) : história natural e adaptações morfo-fisiológicas /
Fernanda da Cruz Centeno. - Rio Claro, 2014
162 f. : il., figs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Denis Otávio Vieira de Andrade

1. Anuro. 2. Ecofisiologia. 3. Anfíbios. 4.
Termorregulação. 5. Adaptação. 6. Campos rupestres. I.
Título.

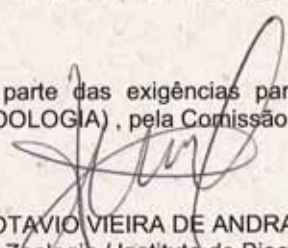
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: O assoolhamento em *Bokermannohyla alvarengai* (Anura, Hylidae): história natural e adaptações morfo-fisiológicas

AUTORA: FERNANDA DA CRUZ CENTENO

ORIENTADOR: Prof. Dr. DENIS OTAVIO VIEIRA DE ANDRADE

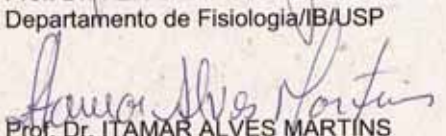
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ZOOLOGIA), pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. DENIS OTAVIO VIEIRA DE ANDRADE
Departamento de Zoologia / Instituto de Biociências de Rio Claro/UNESP


Prof. Dr. CÉLIO FERNANDO BAPTISTA HADDAD
Departamento de Zoologia / Instituto de Biociências de Rio Claro/UNESP

Paula Cabral Eterovick
Prof. Dra. PAULA CABRAL ETEROVICK
PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE MINAS GERAIS - PUC/MG

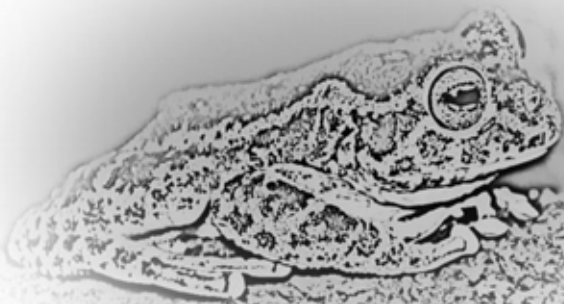

Prof. Dr. FERNANDO RIBEIRO GOMES
Departamento de Fisiologia/IB/USP


Prof. Dr. ITAMAR ALVES MARTINS
Depto de Biologia / Universidade de Taubaté

Data da realização: 03 de outubro de 2014.

Esta tese é dedicada a *Pedro* e *Célia*,
pais os quais muitos sonham, mas poucos têm.

E ao fabuloso mundo das pererecas!



AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a tudo e a todos que de alguma forma contribuíram na realização desta tese, em especial aos sapos, rãs e pererecas, criaturas encantadoras que despertam o desejo do conhecimento e tornam este mundo mais colorido. E à Serra do Cipó, um cenário indescritível com paisagens ímpares que ficarão eternamente como aprazíveis lembranças.

Agradeço ao meu orientador Denis V. Andrade pela oportunidade de desenvolver este projeto de pesquisa, ideias e recursos, e pelo suporte intelectual. À Marta Antoniazzi e Carlos Jared pela colaboração neste projeto de pesquisa, por me receberem no Laboratório de Biologia Celular de braços abertos, pelos cafezinhos e agradáveis conversas sobre o mundo científico. Ao Phil Bishop por me receber no Froglab na Universidade de Otago, pela orientação e amizade, e principalmente por dividir comigo sua paixão pelos anfíbios.

A realização deste projeto só foi possível com a ajuda dos meus queridos companheiros de campo: Roberto Kodama (Beto), Bruno Rocha (Zé Gotinha), Paulo Pinheiro (Xonho), Débora Ramalho (Alcione), Aílton Fabrício Neto (Cascão), Dani Genari, Ana Bárbara Barros, Letícia Sueiro, Henrique Godoy (Etiópia), Denis Andrade, Rafael Bovo, Jaimie Klemish e Paula Eterovick. Agradeço imensamente a força nas longas campanhas no Cipó, a companhia de vocês foi imprescindível. E também agradeço ao Seu Antônio e Michelle pelo aconchego na Casa da Vovó.

Eu gostaria de agradecer ao Parque Nacional da Serra do Cipó (PNSC) e funcionários, em especial ao Lecínio, pela infraestrutura e hospitalidade fornecida durante os trabalhos de campo, ao RAN/ICMBio pela licença de coleta concedida (SISBIO, 22170-1/2010), e ao Prof. Geraldo Wilson Fernandes por disponibilizar sua propriedade para a realização de grande parte dos trabalhos de campo.

Agradeço à FAPESP pelo apoio financeiro através de bolsa concedida no país (2009/15712-0) e bolsa BEPE (2013/14974-7), e à UNESP Rio Claro pela infraestrutura fornecida durante todo o doutorado.

Aos pesquisadores Célio Haddad, Paulo Garcia, Luis Felipe Toledo e Hussan Zaher eu agradeço pela disponibilidade e acesso ao material depositado nas coleções da UNESP Rio Claro, UFMG, ZUEC e MZUSP. Também aos amigos e irmão que colaboraram de forma acadêmica no desenvolvimento desta tese com conselhos estatísticos, sugestões e revisões de capítulos: Aurelien Vivancos, Danilo Centeno, Guilherme Gomes e Thais Condez. Ao Délio Baeta pela ajuda na diafanização dos animais, Pedro Neves pela imensa contribuição na identificação dos conteúdos estomacais e Rafael Bovo pela ajuda nos experimentos de laboratório. E agradeço à minha querida Débora Ramalho que sempre esteve à disposição para ajudar nos procedimentos laboratoriais e organização geral, muito obrigada Alcione!

Agradeço também aos meus amigos do Jacarezário pela boa convivência, conversas e discussões que de alguma forma contribuíram para a evolução desta tese. Aos meus amigos kiwis pelos maravilhosos

momentos durante minha permanência na Nova Zelândia e às minhas queridas amigas Thacy, Mc e Maíra, que mesmo ausentes de corpo sempre estiveram presentes no coração.

Pelos memoráveis momentos filosóficos, poéticos, bucólicos e insanos eu agradeço aos meus amigos Thata, Fran, Paul, Filó, Thiago, Ganso, Xonho, Manu, Azeitona, Guima, Max, Tetê, Quase.... Gostaria de agradecer especialmente aos meus companheiros de copo, risos e lágrimas Thais (minha querida flor de cactus) e Francisco por tornarem minha vida em Rio Claro muito mais prazerosa.

Um agradecimento especial à Luminha por tornar o mundo mais doce. Pour les Français, pour le sentiment inattendu et écrasante qui a jailli dans mon coeur, qui me a donné la force dans l'étape plus difficile de cette journée.

E agradeço finalmente minha família pelo apoio, incentivo, confiança e acima de tudo pelo amor e carinho.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
INTRODUÇÃO GERAL	10
LITERATURA CITADA.....	16
CAPÍTULO I – MORPHOLOGY AND RESOURCES USE IN <i>BOKERMANNOHYLA ALVARENGAI</i> (ANURA: HYLIDAE).....	20
ABSTRACT.....	21
INTRODUCTION.....	21
MATERIAL AND METHODS	23
<i>Study site and data collection</i>	23
<i>Morphology</i>	24
<i>Reproduction</i>	25
<i>Diet composition</i>	26
RESULTS.....	26
<i>Reproduction</i>	27
<i>Diet composition</i>	34
DISCUSSION.....	37
REFERENCES	47
CAPÍTULO II – DISTRIBUIÇÃO ESPAÇO-TEMPORAL DE <i>BOKERMANNOHYLA ALVARENGAI</i> (ANURA: HYLIDAE) NA SERRA DO CIPÓ, SUDESTE DO BRASIL	52
RESUMO	53
INTRODUÇÃO.....	53
MATERIAL E MÉTODOS	56
<i>Área de estudo</i>	56
<i>Coleta de dados</i>	57
<i>Análise de dados</i>	60
RESULTADOS.....	63
DISCUSSÃO.....	75
<i>Padrões de atividade e seleção do ambiente</i>	75
<i>Padrões de deslocamento e área de uso</i>	78
REFERÊNCIAS	80
APÊNDICE 1	89
APÊNDICE 2	90
CAPÍTULO III – A DINÂMICA DA TERMORREGULAÇÃO EM <i>BOKERMANNOHYLA ALVARENGAI</i> (ANURA, HYLIDAE): INTER-RELAÇÕES ENTRE A ECOLOGIA TERMAL E O BALANÇO HÍDRICO	92
RESUMO	93
INTRODUÇÃO.....	94
MATERIAL E MÉTODOS	95
<i>Área de estudo</i>	95
<i>Amostragem dos animais e parâmetros de campo</i>	96
<i>Caracterização do microclima</i>	96
<i>Tolerância a temperaturas críticas</i>	97
<i>Perda evaporativa de água e resistência da pele</i>	99
<i>Taxas de absorção de água</i>	100
<i>Armazenamento de água</i>	100
<i>Análise de dados</i>	101
RESULTADOS.....	101
<i>Relações térmicas</i>	102
<i>Relações hídricas</i>	107
DISCUSSÃO.....	109
REFERÊNCIAS	114

CAPÍTULO IV – THE SKIN OF ANURANS AND BASKING BEHAVIOUR: THE CASE OF THE TREEFROG <i>BOKERMANNOHYLA ALVARENGAI</i> (BOKERMANN, 1956)	122
ABSTRACT.....	123
INTRODUCTION.....	123
MATERIAL AND METHODS	125
<i>The habitat</i>	125
<i>Data collection</i>	125
<i>Morphological analysis</i>	126
<i>Light microscopy (LM)</i>	126
<i>Transmission electron microscopy (TEM)</i>	127
<i>Scanning electron microscopy (SEM)</i>	127
RESULTS.....	127
DISCUSSION.....	133
REFERENCES	137
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	142
ANEXOS	145

RESUMO

O comportamento de assoalhar é incomum em anfíbios já que tem o inconveniente de aumentar os riscos de perda excessiva de água por evaporação (PEA). No entanto, este comportamento parece ser especialmente relevante em regiões de altitude uma vez que possibilita a termorregulação frente às baixas temperaturas. Algumas espécies de anuros são conhecidas por assoalhar de forma eficiente, inclusive em condições privadas de umidade e geralmente são acompanhadas por uma série de adaptações a fim de reduzir a PEA. Este é o caso de *Bokermannohyla alvarengai*, um hilídeo endêmico dos campos rupestres que habita áreas acima de 1000 m de altitude no sudeste do Brasil, no qual o comportamento de assoalhar está associado com mudanças fisiológicas na coloração da pele. Os campos rupestres estão sujeitos a grandes oscilações diárias de temperatura com radiação solar intensa durante o dia e queda acentuada da temperatura a noite, e a termorregulação através do assoalhamento poderia então ser vantajosa neste caso. Por outro lado, este tipo de ambiente apresenta fortes restrições hídricas e, portanto, poderia comprometer o uso eficiente do assoalhamento em anuros como uma estratégia termorregulatória. Embora as mudanças de cor na espécie são conhecidas por atuarem na modulação das trocas de calor durante a exposição à radiação solar, com implicações osmorregulatórias, inúmeras questões sobre adaptações comportamentais e fisiológicas que sustentam o assoalhamento em *B. alvarengai* ainda permanecem inexploradas, e este estudo objetivou preencher essa lacuna de conhecimento. Nesta tese, investiguei aspectos fundamentais do modo de vida de *B. alvarengai* como dieta, reprodução, padrões de atividade e uso do ambiente, assim como características fisiológicas e morfológicas com especial referência às implicações adaptativas no comportamento de assoalhar. *Bokermannohyla alvarengai* assoalha ao longo do ano todo, inclusive distante de corpos d'água, acomodando os aspectos conflitantes envolvidos na economia de água e termorregulação por uma série de especializações comportamentais, fisiológicas e morfológicas. Além da postura de conservação de água e mudança fisiológica na coloração da pele, a espécie apresenta aumento na resistência cutânea à perda de água por evaporação e elevada capacidade de absorção de água. Adicionalmente, o tegumento exhibe adaptações morfofuncionais que permitem o assoalhamento através da produção de muco e secreção lipídica, presença de verrugas por toda a superfície ventral e hipervascularização. Este conjunto de características parece exercer papel crucial no ganho de calor durante o assoalhamento sem comprometer o balanço hídrico, explicando, no caso de *Bokermannohyla alvarengai*, o sucesso adaptativo nos campos rupestres.

Palavras-chave: anfíbios, termorregulação, adaptação, campos rupestres.

ABSTRACT

Basking behaviour is uncommon in amphibians as it has the important drawback of increasing the risk of excessive water loss through evaporation (EWL). However, this behaviour seems to be especially relevant in high elevation regions as it allows thermoregulation in order to face the low temperatures. Some anuran species are known to bask efficiently, even in deprived humidity conditions, and generally are accompanied by several adaptations in order to reduce EWL. This is the case of *Bokermannohyla alvarengai*, a treefrog endemic of *campos rupestres* (rocky meadows) that inhabits areas above 1000 m of altitude in Southeastern Brazil, whom basking behaviour is associated with physiological changes in skin coloration. *Campos rupestres* undergo major daily temperature fluctuations with intense solar radiation during the day and rapid cooling at night, and thermoregulation through basking could be advantageous in such habitat. On the other hand, this environment is subjected to water restrictions that exacerbate problems of EWL and, therefore, compromises efficient use of basking in anurans as thermoregulatory strategy. While colour change in this species is known to be involved in the modulation of heat exchanges during sun exposition, with osmoregulatory implications, many questions remain on the behavioural and physiological adaptations underpinning basking, and this study aims at filling this gap of knowledge. In this thesis, I investigated fundamental aspects of the life history of *B. alvarengai*, such as diet, reproduction, activity patterns and habitat use, but also physiological and morphological features with special reference to their adaptive implications in basking behaviour. *Bokermannohyla alvarengai* basks all year-round, even far from water sources, accommodating the conflicting aspects involved in water economy and thermoregulation by a suite of behavioural, physiological, and morphological specializations. Besides the adoption of water conserving posture and physiological change in skin colouration, the species presents an increased cutaneous resistance to evaporative water loss and high water absorption capacity. Furthermore, the integument exhibits morphofunctional adaptations allowing basking through mucosubstances and lipid skin secretion, presence of folds throughout the ventral surface, and hypervascularization. This set of features is likely to play a crucial role in the heat acquisition through basking without compromising water balance, explaining, in the case of *Bokermannohyla alvarengai*, the successful adaptation in the *campos rupestres*.

Key-words: amphibians, thermoregulation, adaptation, rocky meadows.

INTRODUÇÃO GERAL

A região neotropical abriga a maior diversidade de anfíbios anuros do planeta (DUELLMAN, 1988), sendo o Brasil uma das áreas mais ricas com 913 espécies (SEGALLA et al., 2012). O país abriga dois dos ecossistemas de grande diversidade, elevado endemismo e a maioria de sua área degradada, os *hotspots* mundiais de biodiversidade (MYERS et al., 2000). Dentre eles está o Cerrado, o segundo maior domínio fitogeográfico do Brasil com aproximadamente dois milhões de km² representando 23% da área total do país (RATTER et al., 1997).

Atualmente, o Cerrado apresenta cerca de 20% de sua vegetação original relativamente bem preservada, embora menos de 2% ocorra em áreas de proteção ambiental (MITTERMEIER et al., 2000; DA FONSECA et al., 2005). Contudo, esses remanescentes têm sofrido intensa destruição, principalmente por atividades agrícolas e agropecuárias (RATTER et al., 1997; KLINK & MACHADO, 2005), e estudos estimam que com a taxa de desmatamento atual, chegando a 1,5% ao ano, o bioma fora das unidades de conservação deverá desaparecer no ano de 2030 caso as políticas de conservação e de desenvolvimento vigentes sejam mantidas (MACHADO et al., 2004). Assim, estudos que forneçam informações detalhadas sobre a fauna nativa destes remanescentes são urgentes e de grande importância para a conservação (SILVA & BATES, 2002).

O Cerrado é um complexo vegetacional composto por diferentes fitofisionomias incluindo os campos rupestres que ocorrem no alto das serras, geralmente, em altitudes superiores a 1000 m (AB'SABER, 1977; EITEN, 1978). Os campos rupestres são caracterizados por maciços rochosos, solos oligotróficos e formações herbáceo-arbustivas tipicamente xeromórficas, sujeitos a grandes oscilações diárias de temperatura, exposição ao vento e restrições hídricas (JOLY, 1970; EITEN, 1978; GIULIETTI et al., 1987; GIULIETTI et al., 1997; FURLEY, 1999). Considerando-se os requerimentos fisiológicos e reprodutivos dos anfíbios, essas características poderiam representar um desafio para o estabelecimento do grupo nos campos rupestres. Porém, a ocorrência de uma grande diversidade de anfíbios anuros, incluindo espécies endêmicas, sugere que as particularidades do ambiente podem ter resultado em adaptações locais.

Vários casos de declínios populacionais sugeridos para anfíbios brasileiros referem-se a espécies de altitude (ETEROVICK et al., 2005), sendo que a perda de hábitat é apontada como a principal causa destas retrações face ao elevado nível de endemismos e espécies habitat-especialistas (SILVANO & SEGALLA, 2005; ROSSA-FERES et al., 2008). Porém, outros

fatores como o aquecimento global podem afetar consideravelmente as populações destes animais (ver BEEBEE, 1995; ALFORD & RICHARDS, 1999). Sabe-se que este grupo é caracterizado por ser particularmente sensível a variações ambientais em função de suas exigências ecológicas específicas (ver HADDAD & PRADO 2005). Assim, regiões de altitude podem ser consideradas como especialmente desafiadoras do ponto de vista ecofisiológico para a sobrevivência dos anfíbios, sendo que mudanças climáticas poderiam ser fatais para a manutenção das populações desta taxocenose.

Bokermannohyla alvarengai (Bokermann, 1956) (Figura 1) é uma espécie de hilídeo de altitude endêmico dos campos rupestres de distribuição geográfica restrita à Cadeia do Espinhaço, desde a Serra do Ouro Branco até o sul da Bahia (BOKERMANN, 1964; SÃO PEDRO et al., 2008). É caracterizada pelo porte avantajado, talhe robusto, focinho curto e truncado, antebraço espessado e acúleo desenvolvido no preplex (BOKERMANN, 1956). O conhecimento sobre sua história natural é limitado a informações fragmentadas (e.g. SAZIMA & BOKERMANN, 1977; ETEROVICK & SAZIMA, 2000; ETEROVICK & SAZIMA, 2004; SÃO PEDRO et al., 2008; ETEROVICK et al., 2010), porém, o aspecto mais marcante observado em *B. alvarengai* é o prolongado comportamento de assoalhar (*basking behaviour*), caracterizado pela imobilidade do animal associada às mudanças na coloração da pele (SAZIMA & BOKERMANN, 1977; TATTERSALL et al., 2006). Nesta condição, os animais podem passar longos períodos do dia repousando em rochas completamente expostos à radiação solar, distantes de qualquer corpo d'água (BOKERMANN, 1964; ETEROVICK & SAZIMA, 2004).

De fato, em regiões de altitude o comportamento de assoalhar em anfíbios parece ser especialmente importante para a regulação da temperatura corpórea (VENCES et al., 2002), já que estes ambientes são caracterizados por grande amplitude térmica diária com radiação solar intensa durante o dia e queda acentuada da temperatura a noite. Contudo, o assoalhamento em anfíbios é tido como problemático pois o tegumento altamente permeável destes animais não representa uma barreira significativa para o risco de dessecação inerente ao comportamento (JAMESON, 1966; SHOEMAKER et al., 1992). Ademais, a exposição prolongada dos indivíduos durante o assoalhamento poderia aumentar os riscos de predação (WELLS, 2007). Entretanto, algumas espécies de anuros desenvolveram adaptações especializadas para reduzir a perda de água durante a exposição à radiação solar, possibilitando assim, a termorregulação através do assoalhamento inclusive em ambientes considerados severos para o grupo (BENTLEY, 1966).



Figura 1. *Bokermannohyla alvarengai* (Bokermann, 1956).

Além de mecanismos comportamentais como, por exemplo, a postura de conservação de água (ver STILLE, 1958), adaptações fisiológicas e morfológicas são cruciais na manutenção do assoalhamento em condições privadas de umidade. A mudança fisiológica de cor constitui uma ferramenta funcional na termorregulação e balanço hídrico através da modulação da troca de calor entre o animal e o ambiente (HOPPE, 1979; KING et al, 1994; STEGEN et al., 2004; TATTERSALL et al., 2006). A produção de ceras e secreções lipídicas que são espalhadas sobre a superfície corpórea através de movimentos estereotipados dos membros (*whipping behaviour*), protegem o animal externamente prevenindo a perda excessiva de água por evaporação durante o assoalhamento (BARBEAU & LILLYWHITE, 2005; BLAYLOCK et al., 1976; LILLYWHITE et al., 1997). Além do mais, algumas adaptações morfofuncionais como a espessura da pele, camada calcificada, vascularização e células pigmentares podem favorecer a economia de água do animal durante a exposição à radiação solar (DREWES et al., 1977; TOLEDO & JARED, 1993).

A maneira através da qual *B. alvarengai* lida com taxas de perda de água por evaporação e temperaturas ambientes potencialmente altas durante o assoalhamento foi previamente explorada por Tattersall et al. (2006), especialmente em relação ao papel da mudança fisiológica da coloração da pele. No entanto, inúmeras questões relevantes associadas à forma como tais variáveis são integradas ainda carecem de tratamento aprofundado. Ademais, o papel do tegumento no controle do balanço hídrico e troca de calor durante a exposição à radiação solar em *B. alvarengai*, apesar de indiscutível relevância, permanece inexplorado. Assim, dado o altíssimo interesse biológico tanto pela área de ocorrência quanto pelas peculiaridades biológicas de *B. alvarengai*, o objetivo do presente estudo foi investigar a fundo o modo de vida desta espécie em uma área de campo rupestre na Serra do Cipó, estado de Minas Gerais, sudeste do Brasil (Figura 2).



Figura 2. Localização da área de estudo (estrela) na Serra do Cipó ($19^{\circ}12'$ a $19^{\circ}20'S$, $43^{\circ}30'$ a $43^{\circ}40'W$), estado de Minas Gerais, Brasil.

A presente tese é apresentada na forma de quatro capítulos. Os capítulos 1 e 2 apresentam dados básicos sobre a história natural da espécie focando aspectos como morfologia, biologia reprodutiva, dieta, períodos de atividade e uso do ambiente, procurando entender quais as implicações e consequências (eco, morfo e fisiológicas) do modo de vida e habitat particulares desta espécie. No primeiro capítulo constam dados como dimensões morfométricas, maturação sexual, dimorfismo sexual, fecundidade, biometria dos ovos, ciclo reprodutivo, comportamento reprodutivo, além de uma análise qualitativa e quantitativa da dieta com menção à variação ontogenética. Fazem parte deste capítulo, como forma de apêndice, dois trabalhos submetidos para publicação: "Courtship Behavior of *Bokermannohyla alvarengai*, a Waltzing Anuran" (Appendix 1) submetido para o periódico *Herpetological Review* como forma de artigo, onde descrevemos o comportamento de corte na espécie; e "Updated distribution map of *Acratosaura mentalis* (Squamata: Gymnophthalmidae): a prey species of the treefrog *Bokermannohyla alvarengai* (Anura: Hylidae)" (Appendix 2) submetido para o periódico *Herpetology Notes* como comunicação curta, onde apresentamos dados sobre a predação de um lagarto pela espécie. O segundo capítulo fornece informações abrangentes sobre a ecologia espacial e temporal de *B. alvarengai* detalhando os padrões de atividade diária e sazonalidade, e como a espécie utiliza o ambiente incluindo distribuição macroespacial, preferências de microambiente, padrões de deslocamento e área de uso.

Os capítulos 3 e 4 exploram os principais aspectos relacionados ao comportamento de assoalhar na tentativa de identificar os mecanismos que possibilitam e regulam o assoalhamento na espécie, focando as inter-relações entre controle da temperatura corpórea, manutenção do balanço hídrico e mudança na coloração da pele. O terceiro capítulo apresenta as relações entre o ambiente e o comportamento de assoalhar indicando os principais fatores bióticos e abióticos que influenciam a dinâmica da termorregulação em condições naturais, assim como as capacidades e limitações fisiológicas relacionadas ao assoalhamento como, por exemplo, temperatura operacional, tolerância à temperaturas críticas, taxas de perda evaporativa de água, resistência da pele à evaporação, taxas de absorção e armazenamento de água. Já o quarto capítulo descreve o padrão estrutural do tegumento de *B. alvarengai* com especial referência às estruturas que podem atuar no controle da temperatura corpórea e equilíbrio hídrico durante o assoalhamento como espessura da pele, células pigmentares, vesículas de lipídios, glândulas e vascularização.

LITERATURA CITADA

- AB'SABER, A.N. 1977. Os domínios morfoclimáticos na América do Sul. Primeira aproximação. *Geomorfologia* 52:1-21.
- ALFORD, A.R. & RICHARDS, S.J. 1999. Global amphibian declines: a problem in applied ecology. *Ann Rev Ecol Syst* 3:133-65.
- BARBEAU, T.R. & LILLYWHITE, H.B. 2005. Body wiping behaviors associated with cutaneous lipids in hyloid tree frogs of Florida. *J Exp Biol* 208:2147-2156.
- BEEBEE, T.J.C. 1995. Amphibian breeding and climate. *Nature* 374(6519):219-220.
- BENTLEY, P.J. 1966. Adaptations of Amphibia to arid environments. *Science* 152:619-623.
- BLAYLOCK, L.A., RUIBAL, R. & PLATTALOIA K. 1976. Skin structure and wiping behavior of phyllomedusine frogs. *Copeia* 283-295.
- BOKERMANN, W.C.A. 1956. Sobre uma nova espécie de *Hyla* do estado de Minas Gerais, Brasil (Amphibia, Salientia-Hylidae). *Pap Avul Zool* 12(18):357-362.
- BOKERMANN, W.C.A. 1964. Dos novas espécies de *Hyla* de Minas Gerais y notas sobre *Hyla alvarengai* Bok. (Amphibia, Salientia-Hylidae). *Neotropica* 10:67-76.
- DA FONSECA, G.A.B., RYLANDS, A., PAGLIA, A. & MITTERMEIER, R.A. 2005. Atlantic Forest. In: MITTERMEIER, R.A., GIL, P.R., HOFFMAN, M., PILGRIM, J., BROOKS, T., MITTERMEIER, C.G. LAMOREUX, J. & DA FONSECA, G.A.B. (Org.). Hotspots revisited: earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions. CEMEX: Agrupación Sierra Madre.
- DREWES, R.C., HILLMAN, S.S., PUTNAM, R.W. & SOKOL, O.M. 1977. Water, nitrogen and ion balance in African Treefrog *Chiromantis petersi* Boulenger (Anura-Rhacophoridae), with comments on structure of integument. *J Comp Physiol* 116:257-267.
- DUELLMAN, W.E. 1988. Patterns of species-diversity in anuran amphibians in the American tropics. *Ann Missouri Bot Gard* 75(1):79-104.
- EITEN, G. 1978. Delimitation of Cerrado concept. *Vegetatio* 36:169-178.
- ETEROVICK, P.C. & SAZIMA, I. 2000. Structure of an anuran community in a montane meadow in southeastern Brazil: effects of seasonality, habitat, and predation. *Amphibia-Reptilia* 21:439-461.
- ETEROVICK, P.C. & SAZIMA, I. 2004. Anfíbios da Serra do Cipó, Minas Gerais – Brasil. Belo Horizonte: PUC Minas.
- ETEROVICK, P.C., CARNAVAL, A.C.O.Q., BORGES-NOJOSA, D.M., SILVANO, D.L. & SAZIMA, I. 2005. Amphibian declines in Brazil: an overview. *Biotropica* 37(2):166-179.

ETEROVICK, P.C., OLIVEIRA, F.F. & TATTERSALL, G.J. 2010. Threatened tadpoles of *Bokermannohyla alvarengai* (Anura: Hylidae) choose backgrounds that enhance crypsis potential. *Biol J Linn Soc* 101(2):437-446.

FURLEY, P.A. 1999 The nature and diversity of neotropical savanna vegetation with particular reference to the Brazilian cerrados. *Global Ecol Biogeogr* 8:223-241.

GIULIETTI, A.M., MENEZES, N.M., PIRANI, J.R., MEGURO, M. & WANDERLEY, M.G.L. 1987. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: caracterização e lista de espécies. *Bol Bot* 9:1-151.

GIULIETTI, A.M., PIRANI, J.R. & HARLEY, R.M. 1997. Espinhaço Range region, eastern Brazil. In: DAVIS, S.D., HEYWOOD, V.H., HERRERA-MACBRYDE, O., VILLA-LOBOS, J. & HAMILTON, A.C. (Ed.). *Centres of plant diversity: a guide and strategy for their conservation*, 3. Oxford: Information Press.

HADDAD, C.F.B. & PRADO, C.P.A. 2005. Reproductive modes in frogs and their unexpected diversity in the Atlantic Forest of Brazil. *BioScience* 55(3):207-217.

HOPPE, D.M. 1979. The influence of color on behavioral thermoregulation and hydoregulation. In: BURTT, E.H. (Ed.). *The behavioral significance of color*, pp. 37-62. New York: Garland STPM Press.

JAMESON, D.L. 1966. Rate of weight loss of tree frogs at various temperatures and humidities. *Ecology* 47:605-13.

JOLY, A.B. 1970. *Conheça a Vegetação Brasileira*. São Paulo: Polígono.

KING, R.B., HAUFF, S. & PHILLIPS, J.B. 1994. Physiological color change in the green treefrog: responses to background brightness and temperature. *Copeia* 422-432.

KLINK, C.A. & MACHADO, R.B. 2005. A conservação do Cerrado brasileiro. *Megadiversidade* 1:147-153.

LILLYWHITE, H.B., MITTAL, A.K., GARG, T.K. & AGRAWAL, N. 1997. Wiping behavior and its ecophysiological significance in the Indian Tree Frog *Polypedates maculatus*. *Copeia* 88-100.

MACHADO, R.B., RAMOS NETO, M.B., PEREIRA, P.G.P., CALDAS, E., GONÇALVES, D.A., SANTOS, N.S., TABOR, K. & STEININGER, M. 2004. Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro. Relatório técnico não publicado. Conservação Internacional, Brasília, DF.

MITTERMEIER, R.A., MYERS, N. & MITTERMEIER, C.G. 2000. Hotspots: Earth's Biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions. Mexico City: CEMEX.

MYERS, N., MITTERMEIER, R.A., MITTERMEIER, C.G., DA FONSECA, G.A.B. & KENT, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403(6772):853-8.

RATTER, J.A., RIBEIRO, J.F. & BRIDGEWATER, S. 1997. The Brazilian Cerrado vegetation and threats to its biodiversity. *Ann Bot* 8:223-230.

ROSSA-FERES, D.C., MARTINS, M., MARQUES, O.A.V., MARTINS, I.A., SAWAYA, R.J. & HADDAD, C.F.B. Herpetofauna. In: RODRIGUES, R.R. & BONONI, V.L.R. (Ed.). Diretrizes para a conservação e restauração da biodiversidade no estado de São Paulo, pp. 82-94. São Paulo: Governo do Estado de São Paulo.

SÃO PEDRO, V.A., DRUMMOND, L.O., COSTA, H.C., FERNANDES, V.D. & FEIO, R.N. 2008. Predação de embriões por girinos de *Bokermannohyla alvarengai* (Anura, Hylidae) em riacho temporário na Serra do Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil. *Bol Mus Biol Melo Leitão* 24:111-118.

SAZIMA, I. & BOKERMANN, W.C.A. 1977. Anfíbios da Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil. 3, Observações sobre a biologia de *Hyla alvarengai* Bok. (Anura, Hylidae). *Rev Bras Biol* 37:413-417.

SEGALLA, M.V., CARAMASCHI, U., CRUZ, C.A.G., GARCIA, P.C.A., GRANT, T., HADDAD, C.F.B & LANGONE, J. 2012. Brazilian amphibians – List of species. Disponível em: <<http://www.sbherpetologia.org.br>>. Sociedade Brasileira de Herpetologia. Acesso em: 2 out 2014.

SHOEMAKER, V.H.; HILLMAN, S.S.; HILLYARD, S.D.; JACKSON, D.C.; MCCLANAHAN, L.L.; WITHERS, P.C. & WYGODA, M.L. 1992. Exchange of water, ions, and respiratory gases in terrestrial amphibians. In: FEDER, M.E. & BURGGREN, W.W. (Ed.). *Environmental Physiology of the Amphibians*, pp. 125-150. Chicago: The University of Chicago Press.

SILVA, J.M. & BATES, J.M. 2002. Biogeographic patterns and conservation in the South American Cerrado: a Tropical savanna hotspot. *BioScience* 52: 225-233.

SILVANO, D.L. & SEGALLA, M.V. 2005. Conservation of Brazilian Amphibians. *Conserv Biol* 19:653-658.

STEGEN, J.C., GIENGER, C.M. & SUN, L. 2004. The control of color change in the Pacific tree frog, *Hyla regilla*. *Can J Zool* 82:889-896.

STILLE, W.T. 1958. The water absorption response of an anuran. *Copeia* 217-218.

TATTERSALL, G.J., ETEROVICK, P.C. & ANDRADE, D.V. 2006. Tribute to R. G. Boutilier: Skin colour and body temperature changes in basking *Bokermannohyla alvarengai* (Bokermann 1956). *J Exp Biol* 209:1185-1196.

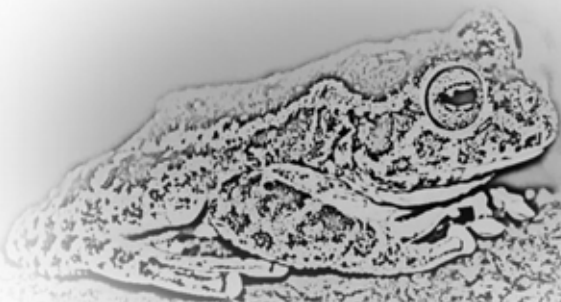
TOLEDO, R.C. & JARED, C. 1993. Cutaneous adaptations to water balance in amphibians. *Comp Biochem Physiol* 105:593-608.

VENCES, M., GALAN, P., VIEITES, D.R., PUENTE, M., OETTER, K. & WANKE, S. 2002. Field body temperatures and heating rates in a montane frog population: the importance of black dorsal pattern for thermoregulation. *Ann. Zool. Fennici* 39:209-220.

WELLS, K.D. 2007. The ecology and behavior of amphibians. Chicago: University of Chicago Press.

CAPÍTULO I

Morphology and resources use in *Bokermannohyla alvarengai* (Anura: Hylidae)



Morphology and resources use in *Bokermannohyla alvarengai* (Anura: Hylidae)

ABSTRACT. *Bokermannohyla alvarengai* is a large treefrog known to spend long periods exposed to full sunlight and, despite the potential influence of this behavior on all major aspects of its life history, some basic ecological traits remain poorly understood. Herein, we report on the natural history of *B. alvarengai*, including aspects of morphometric dimensions, reproductive biology, and patterns of the diet composition in an area of *campos rupestres* (rocky meadows) in the Brazilian Cerrado. The species is sexually dimorphic with males larger than females. Females reach the sexual maturity with 49.41 mm in snout-vent length, and the smallest reproductive male was 64.35 mm. Breeding occurs in temporary streams with rocky bottom from the middle of the dry season to the middle of the rainy season (from July to January). The species displays an unusual array of courtship behavior, exhibiting a unique and previously unreported sequence of complex waltz-like movements in the water. Average number of oocytes per clutch was 1400, and 1.92 mm of oocyte diameter. The average gonad index for females was 4.68%, and 0.085% for males. We found a positive correlation between body size and gonadal traits. *Bokermannohyla alvarengai* display a diverse diet, even ingesting vertebrates. In general, moths, beetles and termites were the most important items. Termites dominated the diet (numerically) in juveniles, and beetles in adults. We found a positive correlation between prey size and body dimensions.

INTRODUCTION

The treefrog *Bokermannohyla alvarengai* (Bokermann, 1956) is a member of the *Bokermannohyla pseudopseudis* Group which is currently composed of *B. alvarengai*, *B. flavopicta*, *B. ibitiguara*, *B. itapoty*, *B. oxente*, *B. pseudopseudis*, *B. saxicola*, and *B. sagarana* (Leite et al., 2012). The species occurs in altitude areas in southeastern Brazil, with distribution throughout the Espinhaço mountain range (Bokermann, 1964; Eterovick and Sazima, 2004). It is endemic of *campos rupestres* (rocky meadows), a typical phytophysognomy of the Brazilian Cerrado in areas above 1000 m (Ab'Saber, 1977; Eiten, 1978). This open formation habitat is covered predominantly by lowgrowing vegetation with few shrubs and small trees amid rocky outcrops (Giulietti et al., 1987), and is characterized by well-defined seasons with a rainy period around summer and dry period around winter (Madeira and Fernandes, 1999).

Bokermannohyla alvarengai is recognized for its biological peculiarities like the striking cryptic coloration and basking behavior (Bokermann, 1964; Sazima and Bokermann, 1977), a challenging behavior for amphibians due to the usually highly permeable skin (Jameson, 1966; Hutchinson and Dupré, 1992; Shoemaker et al., 1992). The animals spend long periods of the day sitting on lichen-covered stones fully exposed to the sun at relatively high temperatures (Sazima and Bokermann, 1977; Eterovick and Sazima, 2004). The means by which *B. alvarengai* copes with excessive overheating and water loss through evaporation during basking were relatively well studied by Tattersall et al. (2006). However, some basic ecological traits remain poorly understood since the knowledge on its natural history is limited to few fragmented reports (e.g. Sazima and Bokermann, 1977; Eterovick and Sazima, 2000; Eterovick and Sazima, 2004; São Pedro et al., 2008; Eterovick et al., 2010).

In general, little data exists on natural history or ecology of Neotropical amphibians (Silvano and Segalla, 2005), information that is particularly relevant in megadiversity-bearing countries facing fast environmental destruction, like Brazil (Eterovick et al., 2005). In fact, habitat loss is pointed as the most visible and probably the main threat to amphibians in Brazil due to the high level of endemism and number of habitat-specialist species, being population declines poorly documented and understood because of a lack of knowledge of the species' biology (Silvano and Segalla, 2005; Rossa-Feres et al., 2008). Furthermore, several records suggest declines of montane and stream-associated populations of Brazilian amphibians in apparently pristine habitats (Eterovick et al., 2005), highlighting the importance of studies on natural history to understand the factors that affect their survival and drive appropriate strategies for conservation (Haddad 1998; Silvano and Segalla, 2005).

Herein, we report aspects of the natural history of *B. alvarengai*, an altitudinal species that, although not currently considered as endangered (IUCN Red List, Bertoluci and Silvano, 2010), dwelling areas of great risk (Young et al., 2001; Eterovick et al., 2005), subject to potential habitat destruction and fragmentation through loss of vegetation cover, water pollution, and siltation (see Eterovick et al. 2009). This study describes the morphometric dimensions of the species evaluating size maturity and sexual dimorphism, and provides detailed information on the reproductive biology and patterns of the diet composition.

MATERIAL AND METHODS

Study site and data collection

Our study was conducted at Serra do Cipó (19°12' to 19°20'S; 43°30' to 43°40'W), located at the southern portion of the Espinhaço mountain range, in Minas Gerais state, Brazil. The altitude varies from ca. 900 to 1250 m above sea level and the landscape is predominantly covered by lowgrowing vegetation with few shrubs and small trees, except near watercourses where small riverine forests are found (Giulietti et al., 1987). The soil is mostly shallow and sandy, with some areas of greater sediment layers (Eterovick and Sazima, 2004), often with strongly diaclasses rock (Vanzolini, 1982). Serra do Cipó is included in the overall Cerrado domain of Central Brazil (savanna-like vegetation; Ab'Saber, 1977; Eiten, 1978), however, at altitudes higher than 1000 m the phytophysignomy of this formation changes considerably and receives the name of *campos rupestres* (rocky meadows). The *campos rupestres* formation is particularly rich in endemic plant and animal species (Giulietti, 1996). The local climate is the altitudinal tropical of the type Cwb (following Köppen's classification; Köppen, 1900). The high seasonality is marked with rainy periods occurring between October and March (spring/summer) and drier periods between April and September (autumn/winter) (Figure 1).

Field data were collected between August 2011 and September 2013. We defined seasons as follows: early wet (EW; October–December), late wet (LW; January–March), early dry (ED; April–June), and late dry (LD; July–September). All specimens collected (SISBIO 22170-1/2010) were fixed in 10% formalin, and maintained in 70% ethyl alcohol. Tadpoles and eggs were fixed and preserved in 5% formalin. In addition to the field samples, we examined specimens of *B. alvarengai* deposited in four scientific collections: Coleção de Anfíbios da Universidade Estadual Paulista, Rio Claro (CFBH); Coleção Herpetológica do Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo (MZUSP); Museu de História Natural, Universidade Estadual de Campinas (ZUEC); and Coleção Herpetológica da UFMG (UFMG).

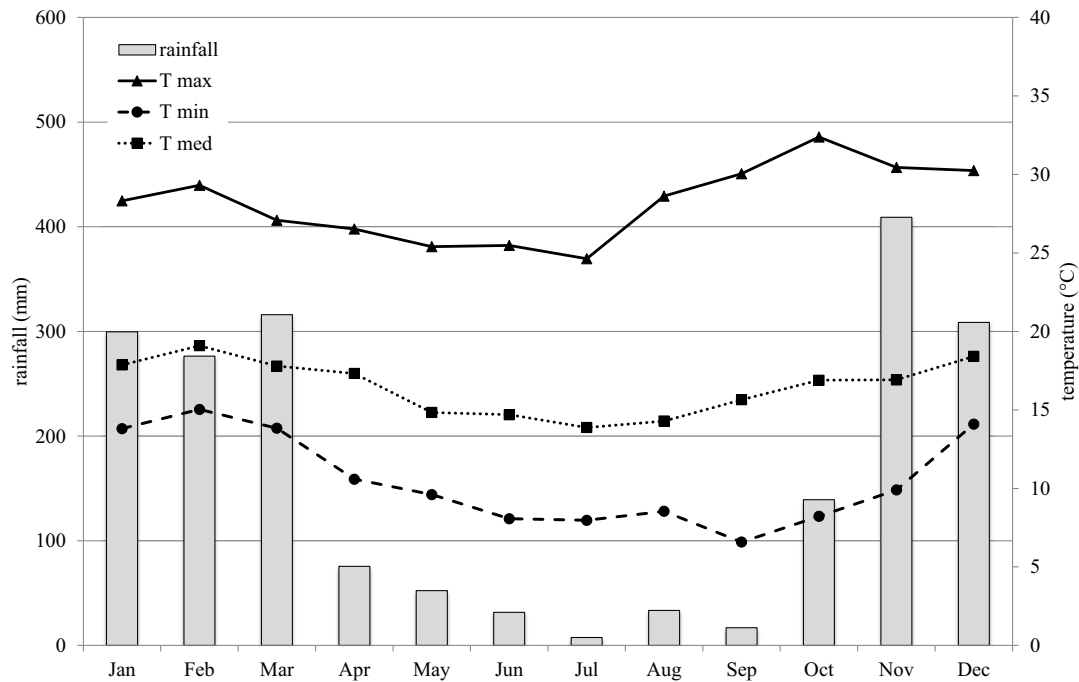


Figure 1. Monthly variation of rainfall (bars) and temperature (lines), from February 2011 to January 2013, at Serra do Cipó, Minas Gerais state, Brazil.

Morphology

The morphometry of the species was characterized according to Duellman (1970) and Heyer et al. (1990). Eighteen morphometric characters of 413 specimens (209 field specimens, and 204 museum specimens) were measured with electronic caliper to the nearest 0.01 mm: snout-vent length (SVL), head width (HeW), head length (HeL), head height (HeH), internasal distance (InD), eye-nostril distance (END), eye-snout distance (ESD), interorbital distance (IoD), eye diameter (EyD), tympanum diameter (TyD), femur length (FeL), tibia length (TiL), tarsus length (TaL), foot length (FoL), arm width (ArW), forearm width (FoW), hand length (HaL), and prepollex length (PrL). To describe age structure, individuals were assigned to one of three age-sex groups: adult female, adult male, and juvenile. To estimate the size at which males and females reach sexual maturity we considered mature females with SVL equal to or above the smallest female found with oocytes, and mature males those with SVL equal to or above the smallest male collected in vocalization activity. Eight-one adult specimens were dissected (20 females and 61 males), and sex was determined by observing the presence of ovaries/oocytes or testes. Based on these individuals, sex of the other specimens (museum specimens lacking the permission to be dissected) was determined by the ratio PrL/SVL. We considered females with a ratio up to 3.14 mm and males higher than 3.37 mm.

To recognize sexual divergences in skeletal structure, specimens of each sex was eviscerated, cleared, and double-stained for bones and cartilages with alizarin red and alcian blue, following procedures adapted from Taylor and Van Dike (1985).

Reproduction

The reproductive period of *B. alvarengai* was determined based on field observations of calling males, courtship, presence of gravid females and clutches. The reproductive site was described based on type of substrate where males called from, and the type of water body used for eggs deposition.

Thirty adult specimens (16 females and 14 males) were used to describe the reproductive traits quantitatively. Only animals considered sexually mature have been included in sexual analysis. Body mass of individuals was measured using a Pesola® balance to the nearest 0.1 g. Gonads and oocytes were measured on electronic balances to the nearest 0.0001 g. All eggs were removed and counted, and the diameter of ten oocytes of each mature female was measured under a magnifying glass. We considered mature those females with rate oocytes/SVL larger than 1.80 mm in diameter. We considered mature oocytes those with differentiation between the animal and vegetal poles (oocytes with more than 1.36 mm in diameter). For estimation of testes volume (mm^3), the ellipsoid formula was used: $V = 4/3\pi(L/2)(W/2)^2$, where L = testes length and W = testes width. All length measurements were taken using electronic caliper to the nearest 0.01 mm.

To measure fecundity in females, a correlation was used between body size and size of oocytes and clutches (number of oocytes per clutch). By way of comparison with other species, the ovarian size factor (OSF; Duellman and Crump, 1974) was calculated from the means: $OSF = CS \cdot OD / SVL$, where CS = clutch size, OD = oocyte diameter, and SVL = snout-vent length. To measure the reproductive effort in both sexes, the gonad index (GI; Barber and Blake, 2006) was used, which expresses gonadal mass as a proportion of total body mass by the formula: $GI = (GM/BM)100$, where GM = gonadal mass, and BM = body mass. The reproductive cycle was analyzed considering the variation of gonad index along the seasons.

The occurrence of sexual dimorphism on morphometric variables was assessed by a multivariate analysis of covariance (MANCOVA), using sex as categorical variable, and SVL as covariate to eliminate the size effect within morphological measurement. As an exploratory tool, a principal component analysis (PCA) on shape was used to visualize and describe the

variation between the sexes in multivariate space. Fecundity relationships were investigated using linear regression analysis.

Diet composition

Stomach, intestinal contents, and feces of 96 individuals were examined to determine the diet composition of *B. alvarengai*. For those individuals captured and released in the field, we used a stomach-flushing method (cf. Legler and Sullivan, 1979, modified by Solé et al., 2005) for retrieving their stomach content. Prey items were identified to order or family, counted, measured under a magnifying glass, and stored in 70% ethanol. The length and width of intact prey were measured with electronic caliper (precision of 0.01 mm) for volume estimates by the prolate spheroid formula: $V = 4/3\pi(1/2 \text{ prey length})(1/2 \text{ prey width})^2$ (Vitt and Caldwell, 1994). The length corresponds to the axis of greatest length of the prey, and width as the greatest axis perpendicular to the length. Importance index (I_x ; cf. Howard et al., 1999) was calculated to determine the importance of each prey category in the diet based on: $I_x = (FO\% + NP\% + VP\%) / 3$, where $FO\%$ = frequency of occurrence, $NP\%$ = numeric proportion, and $VP\%$ = volumetric proportion. The higher the index, the higher the importance of each category of prey.

Relationships between prey volume and frog size were tested by linear regression analysis using the morphometric variables snout-vent length (SVL) and head width (HeW). Total prey volume in contents of juveniles and adults was compared with an analysis of variance (ANOVA).

RESULTS

Average for 18 morphometric measurements of 413 individuals are given in Table 1. *Bokermannohyla alvarengai* varied from 15.80 to 126.63 mm in SVL, being the first the minimum size of newly metamorphosed froglets. Females reach the sexual maturity with 49.41 mm in SVL (smallest female with oocytes), and males with 64.35 mm (smallest male in vocalization activity). Reproductive traits are given in Table 2.

Reproduction

The species is sexually dimorphic in all morphometric variables (MANCOVA, Wilks' $\lambda = 0.2556$, $p < 0.001$). The PCA applied generated two principal components accounting for 87.7% of the total data variance (Table 3; Figure 2). The first principal component accounted for 83.9% of the entire variance and the most representative variables in this axis were, in decreasing order: (1) head width, (2) head length, (3) hand length, and (4) snout-vent length; and for PC2 (3.8%): (1) tarsus length, (2) prepollex length, (3) forearm width, (4) arm width, (5) tibia length, and (6) femur length. It means that individuals toward upper left (on Figure 2), composed basically of females, have smaller head and body size, thin forelimbs, and short prepollex. Males, on the other hand, are generally longer with larger head, and forelimbs more developed.

Apart from differences in body size, the prepollex is structurally different between females and males in *B. alvarengai*. Male showed well-developed distal prepollex entirely ossified, with spur posterior oriented (Figure 3A). In female, the spur is parallel to the metacarpal II showing a chondrified middle region with only the proximal half and tip ossified (Figure 3B).

As previously described by Sazima and Bokermann (1977), *B. alvarengai* breeds in temporary streams with rocky bottom running on the low and sparse vegetation typical of its altitude habitat. The species presents the prolonged breeding pattern (*sensu* Wells, 1977a) from the middle of the dry season to the middle of the rainy season (from July to January) (Figure 4; see also Sazima and Bokermann, 1977; Eterovick and Sazima, 2000). Only one courtship behavior of a couple of *B. alvarengai* was observed during the study period, with an unsuccessful mating. The species displays an unusual array of courtship behavior, exhibiting a unique and previously unreported sequence of complex waltz-like movements in the water. Details can be found in Appendix 1.

Table 1. Morphometric measurements of juveniles, females and males of *Bokermannohyla alvarengai*. Measurements are given in millimeters.

	juveniles (<i>n</i> = 181)		females (<i>n</i> = 113)		males (<i>n</i> = 119)	
	$\bar{x} \pm SD$	range	$\bar{x} \pm SD$	range	$\bar{x} \pm SD$	range
snout-vent length	31.36 $\pm$ 9.43	15.80–49.02	71.42 $\pm$ 12.18	49.41–98.77	86.85 $\pm$ 11.80	64.35–126.63
head width	12.71 $\pm$ 4.19	2.14–20.36	30.22 $\pm$ 5.61	20.73–42.44	37.62 $\pm$ 5.07	26.36–51.10
head length	11.31 $\pm$ 3.26	2.66–17.34	24.24 $\pm$ 3.92	17.01–32.51	29.17 $\pm$ 3.49	21.36–37.48
head height	6.60 $\pm$ 1.69	2.99–9.77	13.07 $\pm$ 2.06	8.08–17.90	15.48 $\pm$ 2.04	10.79–19.95
internasal distance	2.71 $\pm$ 0.64	1.07–4.24	5.17 $\pm$ 0.90	3.35–7.47	6.24 $\pm$ 0.85	4.39–8.18
eye-nostril distance	3.10 $\pm$ 0.80	1.52–4.84	6.01 $\pm$ 0.94	4.08–7.94	7.33 $\pm$ 0.94	5.04–9.87
eye-snout distance	5.12 $\pm$ 1.40	2.38–8.12	10.63 $\pm$ 1.77	7.30–14.43	13.08 $\pm$ 1.71	8.67–16.51
interorbital distance	7.10 $\pm$ 1.93	3.83–11.23	14.33 $\pm$ 2.14	10.30–18.54	17.31 $\pm$ 2.10	10.96–21.20
eye diameter	3.81 $\pm$ 1.05	1.82–5.94	7.56 $\pm$ 1.11	5.03–10.07	8.58 $\pm$ 1.00	6.24–10.68
tympanum diameter	2.18 $\pm$ 1.20	0.56–13.15	5.10 $\pm$ 0.95	3.18–6.91	6.08 $\pm$ 0.83	4.42–8.39
hand length	9.32 $\pm$ 3.01	4.36–15.25	22.45 $\pm$ 4.53	14.35–31.25	29.63 $\pm$ 4.59	20.13–42.74
arm width	1.87 $\pm$ 0.71	0.73–4.21	4.42 $\pm$ 1.12	2.32–8.98	7.08 $\pm$ 2.32	3.56–20.14
forearm width	2.72 $\pm$ 1.02	0.75–5.07	6.39 $\pm$ 1.45	2.35–9.09	11.21 $\pm$ 3.38	5.03–19.54
femur length	16.92 $\pm$ 5.65	7.11–28.10	40.43 $\pm$ 7.05	26.52–52.88	49.75 $\pm$ 6.55	36.22–67.69
tibia length	16.49 $\pm$ 5.74	6.81–27.38	39.16 $\pm$ 6.56	26.67–51.48	47.50 $\pm$ 5.80	34.39–62.54
tarsus length	10.11 $\pm$ 3.40	3.66–17.76	23.16 $\pm$ 4.39	13.53–32.66	27.74 $\pm$ 4.16	18.19–39.05
foot length	11.73 $\pm$ 3.87	5.16–19.04	28.17 $\pm$ 5.14	18.02–39.01	35.09 $\pm$ 5.01	24.55–47.66
prepollex length	0.14 $\pm$ 0.31	0.21–1.39	1.39 $\pm$ 0.54	0.28–2.54	5.44 $\pm$ 1.42	2.34–8.70

Table 2. Reproductive traits of adult females and males of *Bokermannohyla alvarengai*. Results are shown as average $\pm$ SD (range).

	SVL (mm)	body mass (g)	gonad mass (g)	gonad index (%)
females	nongravid (<i>n</i> = 5)			
	73.62 $\pm$ 7.7 (63.01–81.94)	36.90 $\pm$ 13.77 (22.84–53.00)	0.12 $\pm$ 0.09 (0.05–0.27)	0.32 $\pm$ 0.19 (0.12–0.54)
	immature (<i>n</i> = 5)			
	78.08 $\pm$ 3.36 (73.14–81.59)	39.48 $\pm$ 13.55 (23.64–54.70)	0.63 $\pm$ 0.62 (0.14–1.64)	1.72 $\pm$ 1.96 (0.58–5.17)
	mature (<i>n</i> = 6)			
	76.83 $\pm$ 14.26 (49.41–86.65)	41.87 $\pm$ 18.63 (14.00–67.24)	4.37 $\pm$ 2.04 (1.50–6.16)	10.79 $\pm$ 3.9 (5.76–17.60)
males (<i>n</i> = 14)				
	85.34 $\pm$ 12.29 (64.35–108.82)	61.4.7 $\pm$ 29.1 (17.9–118.0)	0.048 $\pm$ 0.022 (0.020–0.085)	0.085 $\pm$ 0.034 (0.046–0.175)

Table 3. The first two principal components extracted by the PCA on 18 morphometric variables. Measure abbreviations are in Material and Methods.

Morphometric variables	PC 1	PC 2
SVL	0.249	0.057
HeW	0.252	0.018
HeL	0.252	-0.084
HeH	0.237	-0.025
InD	0.232	0.161
END	0.232	-0.104
ESD	0.243	-0.202
IoD	0.249	-0.031
EyD	0.207	-0.200
TyD	0.230	-0.116
FeL	0.247	0.210
TiL	0.245	0.253
TaL	0.196	0.688
FoL	0.246	0.165
ArW	0.228	-0.214
FoW	0.232	-0.247
HaL	0.250	0.059
PrL	0.209	-0.372
Eigenvalue	151.023	0.685
% total variance	83.9	3.8

Males were observed calling at night in July ($n = 1$) and November ($n = 11$), with advertisement calls given sporadically. They call isolated from each other close to the streams on rocks or cavities in vertical earthen walls. We recorded only one male calling on vegetation, perched 1 m above the ground on a plant of the family Velloziaceae, a typical herbaceous from the Serra do Cipó formation.

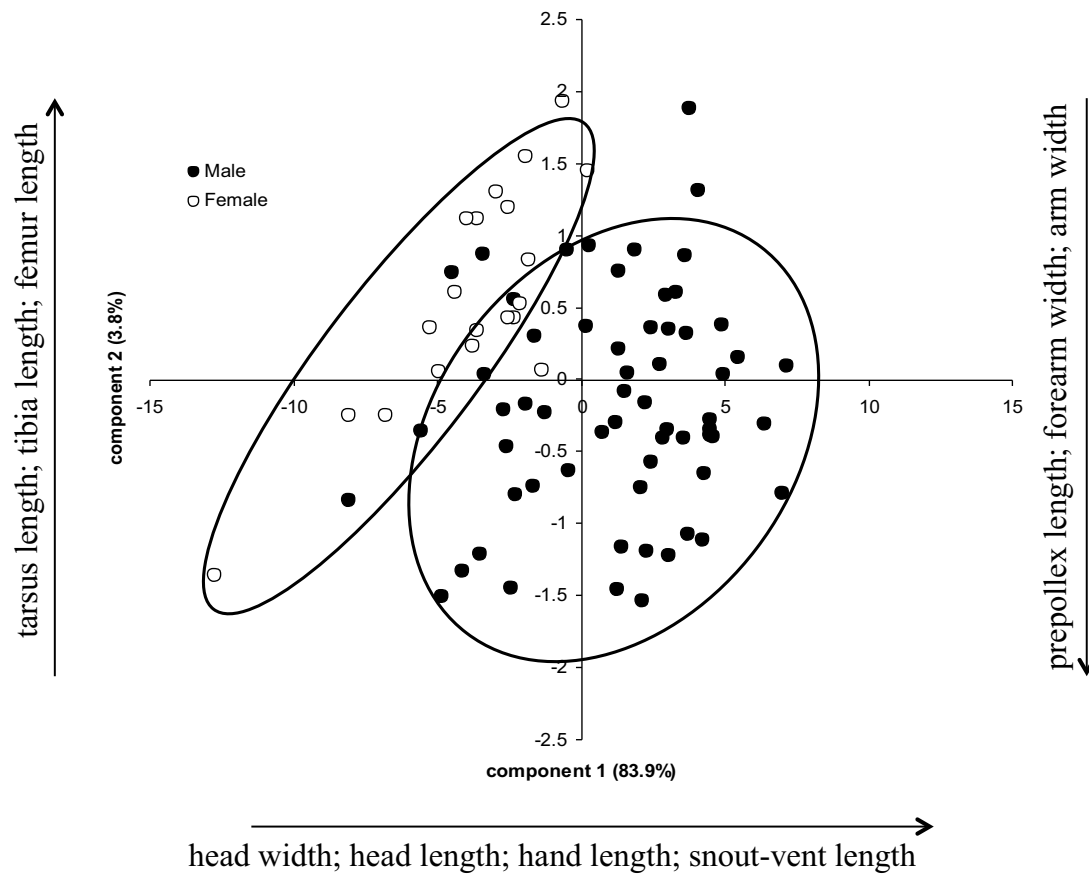


Figure 2. Projection of individual scores of both sexes resulting from the principal component analysis for 18 morphometric variables used in the account in the space of the first with the second component. The contribution of each axis for total variation is indicated in parenthesis.

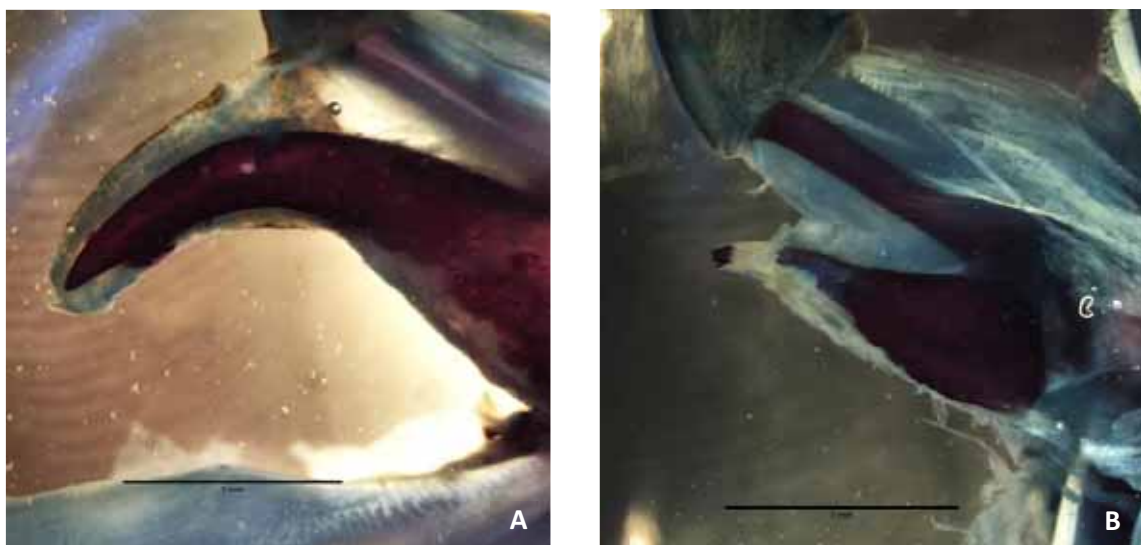


Figure 3. Comparison of prepollex morphology (right hand) between male (A) and female (B) of *Bokermannohyla alvarengai*, cleared and double-stained. Scale bar = 5 mm.

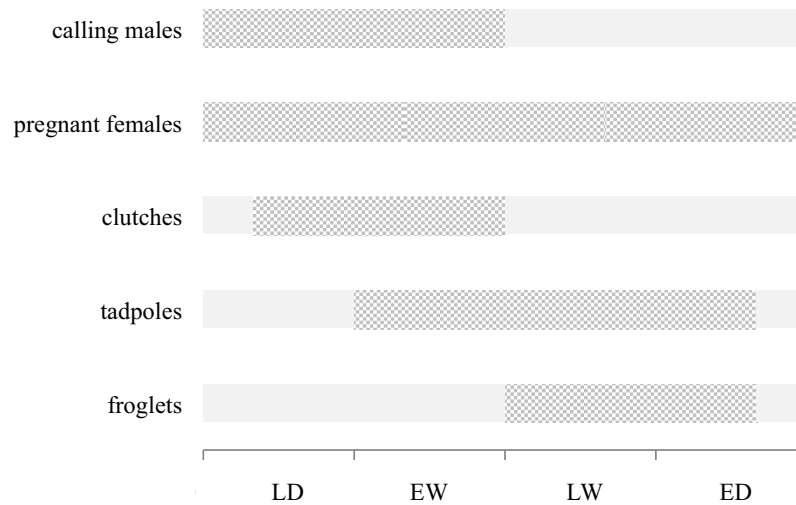


Figure 4. Reproductive period of *Bokermannohyla alvarengai*. **LD:** late dry (July–September); **EW:** early wet (October–December); **LW:** late wet (January–March); and **ED:** early dry (April–June).

Bokermannohyla alvarengai presents the reproductive mode number 2 laying eggs in lotic water (cf. Haddad and Prado 2005). Clutches consist of a loose aggregate deposited on streams where they remain attached to the bottom or submerged vegetation/wood. We recorded one clutch in August and five in November (Figure 4). Eggs are individually surrounded by gelatinous capsules (6.43 ± 0.36 mm of diameter with the jelly envelope), with a dark pigmented animal pole and a cream vegetative pole. As only two clutches were collected in the field and fixed for counting, we also used mature oocytes to estimate clutch size and oocyte size. Average number of oocytes per clutch was 1400 ± 293 (range = 1138–1829, $n = 8$), and the average oocyte diameter was $1.92 \text{ mm} \pm 0.3$ (range = 1.31–2.55, $n = 100$ eggs of 10 females). One female caught on LD had 2095 immature oocytes with mean diameter of 1.04 mm. The OSF in *B. alvarengai* was 29.87.

There was a significant positive relationship between female SVL and clutch size ($r^2 = 0.845$, $p = 0.009$, $n = 6$) (Figure 5A), and body mass and clutch size ($r^2 = 0.754$, $p = 0.025$, $n = 6$) (Figure 5B). A positive correlation also was found between SVL and ovarian mass ($r^2 = 0.832$, $p = 0.011$, $n = 6$) (Figure 5C), and the correlation between body mass and ovarian mass was marginally significant ($r^2 = 0.643$, $p = 0.055$, $n = 6$) (Figure 5D). The average GI of females was $4.68\% \pm 5.50$ (range = 0.12–17.60, $n = 16$) (Table 2). The minimum GI was observed during the LW ($0.38\% \pm 0.21$) with a continuous increase until the next EW ($10.79\% \pm 3.90$) (Figure 6).

Significant correlation was found between SVL and testes mass ($r^2 = 0.333$, $p = 0.031$, $n = 14$) (Figure 5E), and body mass and testes mass ($r^2 = 0.553$, $p = 0.002$, $n = 14$) (Figure 5F). The average GI for males was $0.085\% \pm 0.034$ (range = 0.046–0.175, $n = 14$) (Table 2). Nevertheless, differently from the females, males presented the highest GI during the ED ($0.132\% \pm 0.04$) (Figure 6).

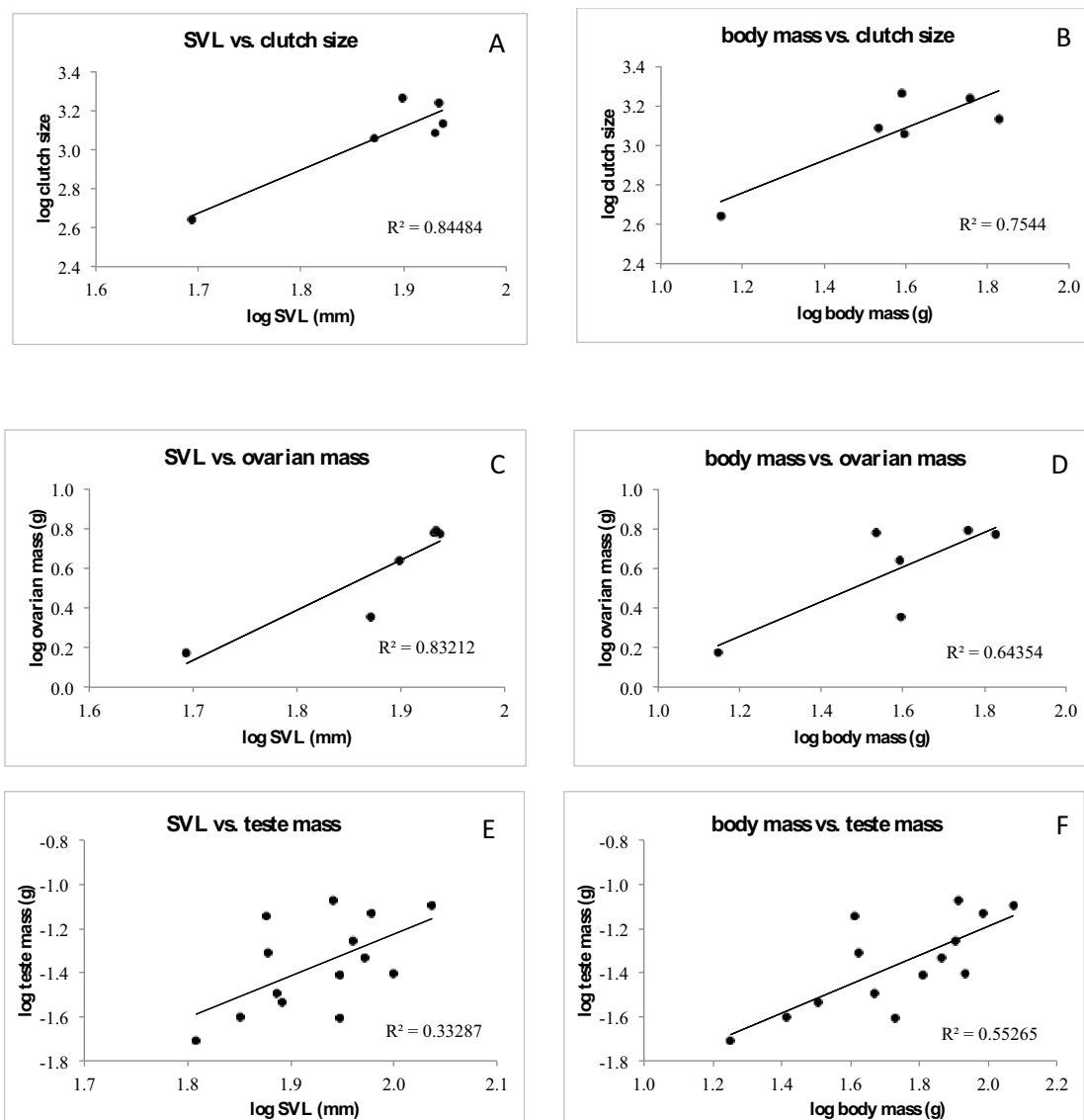


Figure 5. Size-fecundity relationships in females (A–D) and males (E–F) of *B. alvarengai*. SVL: snout-vent length (mm). Clutch size: average number of oocytes per clutch.

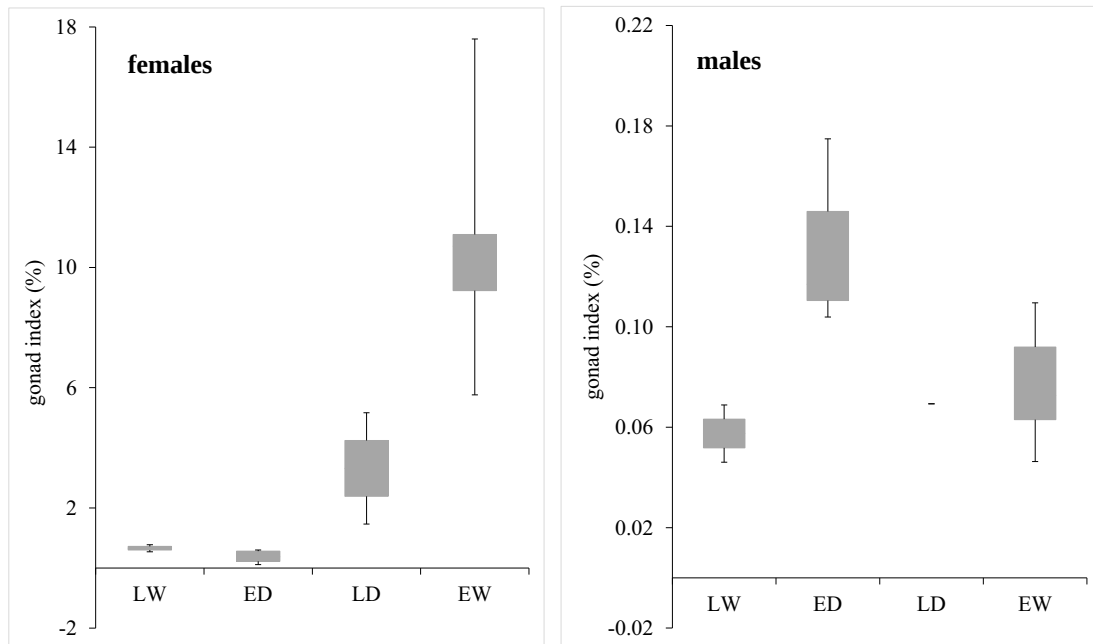


Figure 6. Reproductive cycle of females and males of *Bokermannohyla alvarengai* throughout the seasons based on gonad index (%). LW: late wet season; ED: early dry; LD: late dry; and EW: early wet.

Diet composition

The diet of *B. alvarengai* consists of a wide array of prey types indicating the species as a generalist predator (Table 4). We found 355 items in 96 animals, which 40 items from 7 frogs could not be identified due the advanced digestion process. From 315 identified items, only 103 from 47 frogs were fit to volume measurements (Table 5). The categories Collembola, Opiliones, Scutigermorpha and Squamata were excluded from volume analysis due the absence of intact prey.

The number of items per frog ranged from 1 to 30 with an average of 3.4 items per frog. In terms of relative frequency, the predominant categories of prey items were Coleoptera (18%), Isoptera (16%), Araneae (10.7%), and Orthoptera (8.3%) (Figure 7). There was an ontogenetic difference in food consumption with juveniles preying preferably termites (Isoptera), and adults preferably beetles (Coleoptera) (Figure 8). At the order level, three categories of prey were exclusive of juveniles (Collembola, Isoptera, and Psocoptera), and four of adults (Acari, Phasmatodea, Scutigermorpha, and Squamata) (Figure 8). The stomach of one male contained parts of a lizard belonging to the family Gymnophthalmidae, *Acratosaura mentalis* (see details in Appendix 2).

Table 4. Diet composition of *Bokermannohyla alvarengai* at Serra do Cipó, Minas Gerais state, Brazil. Number (n) and relative proportion (%) of each category of prey.

Category of prey	juveniles (n = 43)		adults (n = 53)			
	n	%	females (n = 27)		males (n = 26)	
			n	%	n	%
Acari			1	1.0		
Araneae						
<i>Araneidae</i>			1	1.0		
<i>Ctenidae</i>					1	1.2
<i>Lycosidae</i>			1	1.0		
<i>Unidentified</i>	16	9.3	5	5.0	8	9.8
Archaeognatha						
<i>Meinertellidae</i>	1	0.6	2	2.0	1	1.2
Blattaria	4	2.3	4	4.0	10	12.2
<i>Nymph</i>			1	1.0		
<i>Ootheca</i>					1	1.2
Coleoptera						
<i>Carabidae</i>					1	1.2
<i>Cerambycidae</i>					1	1.2
<i>Chrysomelidae</i>			1	1.0	1	1.2
<i>Curculionidae</i>	18	10.5	3	3.0	5	6.1
<i>Elateridae</i>			2	2.0	1	1.2
<i>Scarabaeidae</i>			8	7.9	6	7.3
<i>Unidentified</i>	3	1.7	3	3.0	1	1.2
Collembola						
<i>Paronellidae</i>	5	2.9				
Diptera						
<i>Larva</i>			1	1.0	10	12.2
<i>Unidentified</i>	1	0.6	1	1.0		
Hemiptera						
<i>Cicadellidae</i>	2	1.2				
<i>Cicadidae</i>			1	1.0		
<i>Coreidae</i>	2	1.2				
<i>Delphacidae</i>	2	1.2				
<i>Lophopidae</i>	2	1.2				
<i>Pentatomidae</i>	1	0.6				
<i>Reduviidae</i>	1	0.6				
<i>Scutelleridae</i>	1	0.6				
<i>Unidentified</i>	2	1.2				
Hymenoptera						
<i>Formicidae</i>	4	2.3	5	5.0	4	4.9
<i>Unidentified</i>			2	2.0		

Table 4. Cont.

Isoptera						
<i>Termitidae</i>	48	27.9				
Lepidoptera						
<i>Geometridae</i>	1	0.6	1	1.0	1	1.2
<i>Noctuidae</i>	2	1.2	1	1.0	2	2.4
<i>Saturniidae</i>			1	1.0		
<i>Tineidae</i>	1	0.6				
<i>Larva</i>	7	4.1	4	4.0	5	6.1
<i>Unidentified</i>	6	3.5	3	3.0	3	3.7
Opiliones	1	0.6	5	5.0		
Orthoptera						
<i>Gryllidae</i>			2	2.0		
<i>Tetrigidae</i>	1	0.6				
<i>Tettigonidae</i>	4	2.3	5	5.0	2	2.4
<i>Unidentified</i>	7	4.1	1	1.0	3	3.7
Phasmatodea						
<i>Heteronemiidae</i>					1	1.2
<i>Eggs</i>			17	16.8		
Psocoptera	1	0.6				
Scolopendromorpha	1	0.6	3	3.0	5	6.1
Scorpiones						
<i>Bothriuridae</i>	2	1.2	1	1.0		
<i>Buthidae</i>	1	0.6				
Scutigeromorpha			1	1.0		
Squamata						
<i>Gymnophthalmidae</i>					1	1.2
Zygentoma						
<i>Lepismatidae</i>	3	1.7	2	2.0	1	1.2
Advanced digestion	21	12.2	12	11.9	7	8.5
Total	172	100	101	100	82	100

Considering the I_x , moths followed by beetles and termites were the items with the highest values for all combined frogs. Evaluating separately juveniles from adults, the items showed different I_x (Table 5). However, only one juvenile was responsible for the high index of termites in the sample indicating low consumption of this prey category; excluding this item from the juveniles' diet, same trend of I_x was observed between juveniles and adults. *Bokermannohyla alvarengai* increased in relative values its use of large prey with ontogeny (ANOVA, $F_{1,45} = 2.925$, $P < 0.001$), which means that adults have greater total prey volume

when compared to juveniles of equal size. Even so, despite the low intake, small preys still were found in the diet of adults. A positive correlation was found between SVL and prey volume ($r^2 = 0.287$, $p < 0.001$, $n = 103$) (Figure 9A), and HeW and prey volume ($r^2 = 0.205$, $p < 0.001$, $n = 103$) (Figure 9B).

DISCUSSION

Contrary to the pattern usually observed in anurans with females larger than males (cf. Shine, 1979), males of *B. alvarengai* were larger than females corroborating previous reports for the species (e.g. Sazima and Bokermann, 1977; Eterovick and Sazima, 2004). According to Shine (1979), the occurrence of male combat in a species is the major determinant of whether or not males attain body sizes as large as those of females. In *B. alvarengai*, we found several adult males with scars on the dorsum, including one with serious injuries likely caused by prepollical spines, probably resulted from fighting (Figure 10). The scars noticed in *B. alvarengai* were very similar in appearance to those observed in its congeneric species *B. ibitiguara*, which also were pointed as a consequence of male fights (Nali and Prado, 2012). Furthermore, in the Gladiators Frogs (see Faivovich et al., 2005 for species allocated in the clade), a group of species with extremely pugnacious behavior and well-developed prepollical spines (Kluge, 1979), males are also larger than females as observed in *B. alvarengai*.

In fact, besides differences in sexual size dimorphism (SSD), hypertrophied arms and the possession of secondary sexual characters are common in males of anurans known to engage in physical combats (Lutz, 1960; Kluge, 1981). Both of these characters were apparent in *B. alvarengai*, whose males possess a strongly hypertrophied forelimbs and a prepollex larger and more robust than females. Sexual dimorphism in prepollex was also detected in other species of anurans being soft with more chondrogenic elements in females, and well developed defined with ossified elements in males (e.g. Fabrezi, 2001; Garcia et al., 2008; see also De la Riva, 1994; Cadle, 1995). As well as in these species, the pattern of the prepollex structure observed in *B. alvarengai* appears to be another evidence of adaptation for physical confrontation, conferring advantageous during wrestling bouts since the prepollical structure may be used as offensive weapons.

Table 5. Frequency of occurrence (FO), numeric proportion (NP), volumetric proportion (VP), and importance index (I_x) of prey category consumed by *Bokermannohyla alvarengai*, considering only categories with intact preys.

category of prey	all frogs (<i>n</i> = 47)						juveniles (<i>n</i> = 21)						adults (<i>n</i> = 26)					
	<i>n</i>	FO (%)	NP (%)	VP (%)	<i>I</i> _x	<i>n</i>	FO (%)	NP (%)	VP (%)	<i>I</i> _x	<i>n</i>	FO (%)	NP (%)	VP (%)	<i>I</i> _x			
Acari	1	2.13	0.97	0.01	1.04	0	-	-	-	-	1	3.85	2.17	0.01	2.01			
Araneae	5	8.51	4.85	1.56	4.98	2	9.52	3.51	3.59	5.54	3	7.69	6.52	1.33	5.18			
Archaeognatha	3	4.26	2.91	0.51	2.56	0	-	-	-	-	3	7.69	6.52	0.56	4.93			
Blattaria	2	4.26	1.94	2.11	2.77	1	4.76	1.75	3.14	3.22	1	3.85	2.17	1.99	2.67			
Coleoptera	14	23.40	13.59	22.45	19.81	5	19.05	8.77	16.32	14.71	9	26.92	19.57	23.15	23.21			
Diptera	10	12.77	9.71	4.29	8.92	1	4.76	1.75	0.03	2.18	9	19.23	19.57	4.77	14.52			
Hemiptera	6	6.38	5.83	1.08	4.43	6	14.29	10.53	10.48	11.77	0	-	-	-	-			
Hymenoptera	3	6.38	2.91	0.41	3.24	2	9.52	3.51	1.93	4.99	1	3.85	2.17	0.24	2.09			
Isoptera	30	2.13	29.13	0.79	10.68	30	4.76	52.63	7.66	21.68	0	-	-	-	-			
Lepidoptera	11	23.40	10.68	43.53	25.87	4	19.05	7.02	30.35	18.80	7	26.92	15.22	45.05	29.06			
Orthoptera	4	8.51	3.88	11.76	8.05	2	9.52	3.51	2.24	5.09	2	7.69	4.35	12.85	8.30			
Phasmatodea	5	6.38	4.85	3.57	4.94	0	-	-	-	-	5	11.54	10.87	3.98	8.80			
Psocoptera	1	2.13	0.97	0.11	1.07	1	4.76	1.75	1.02	2.51	0	-	-	-	-			
Scolopendromorpha	2	4.26	1.94	2.20	2.80	0	-	-	-	-	2	7.69	4.35	2.45	4.83			
Scorpiones	1	2.13	0.97	0.63	1.24	1	4.76	1.75	6.12	4.21	0	-	-	-	-			
Zygentoma	5	10.64	4.85	5.00	6.83	2	9.52	3.51	17.11	10.05	3	11.54	6.52	3.60	7.22			

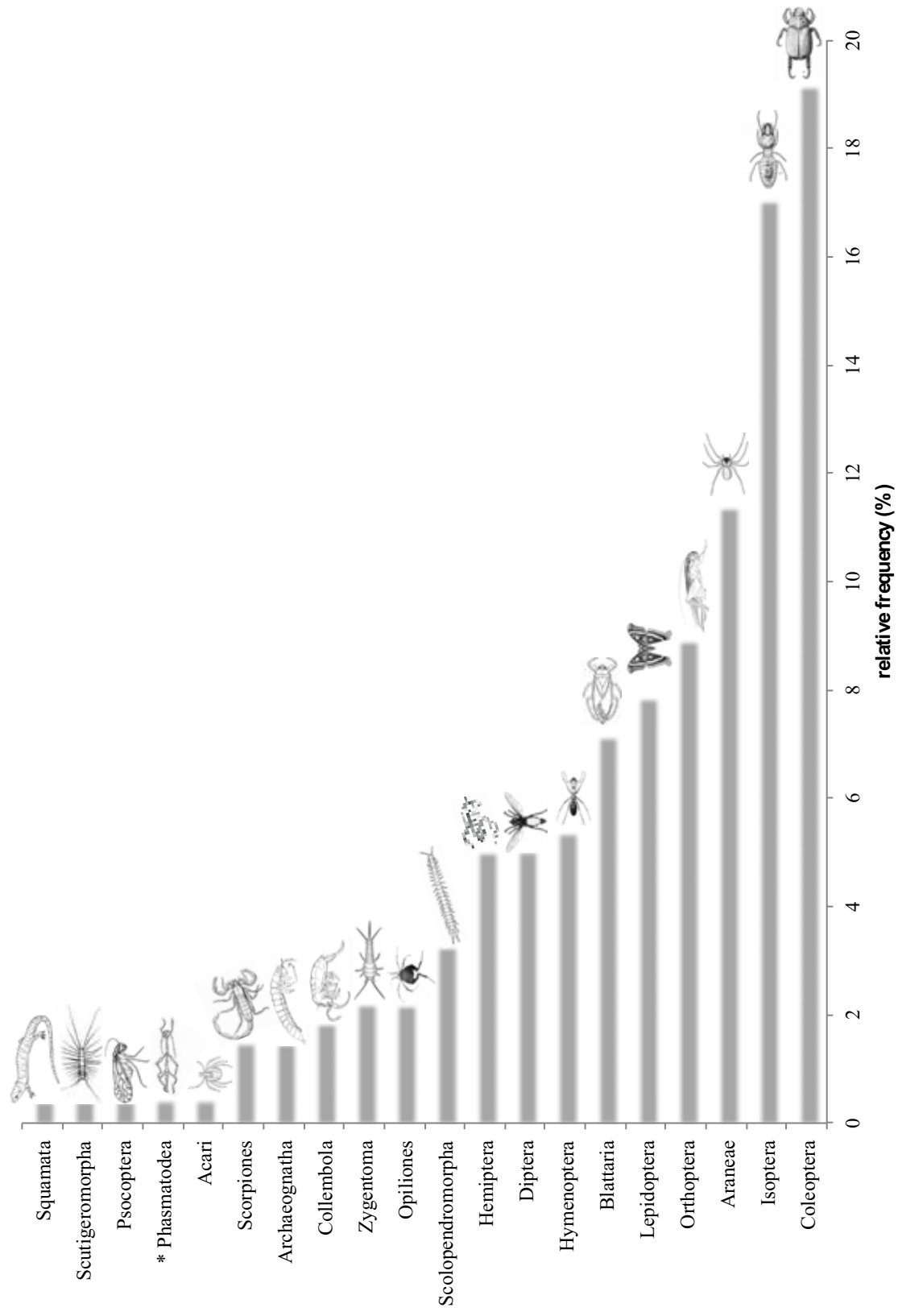


Figure 7. Relative frequency of each category of prey in *Bokermannohyla alvarengai* for all combined frogs. *eggs excluded.

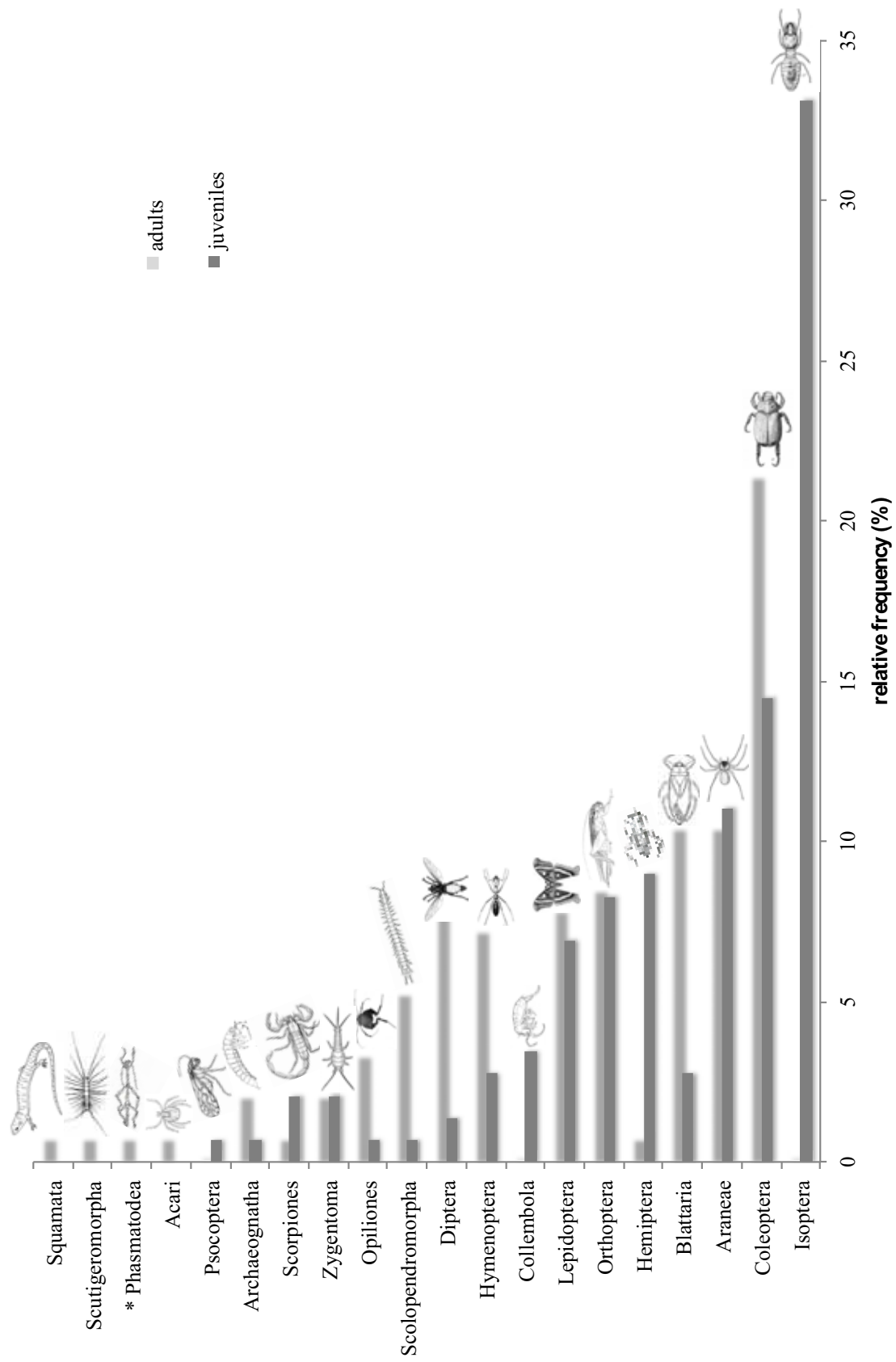


Figure 8. Relative frequency of each category of prey in *Bokermannohyla alvarengai* for juveniles and adults. *eggs excluded.

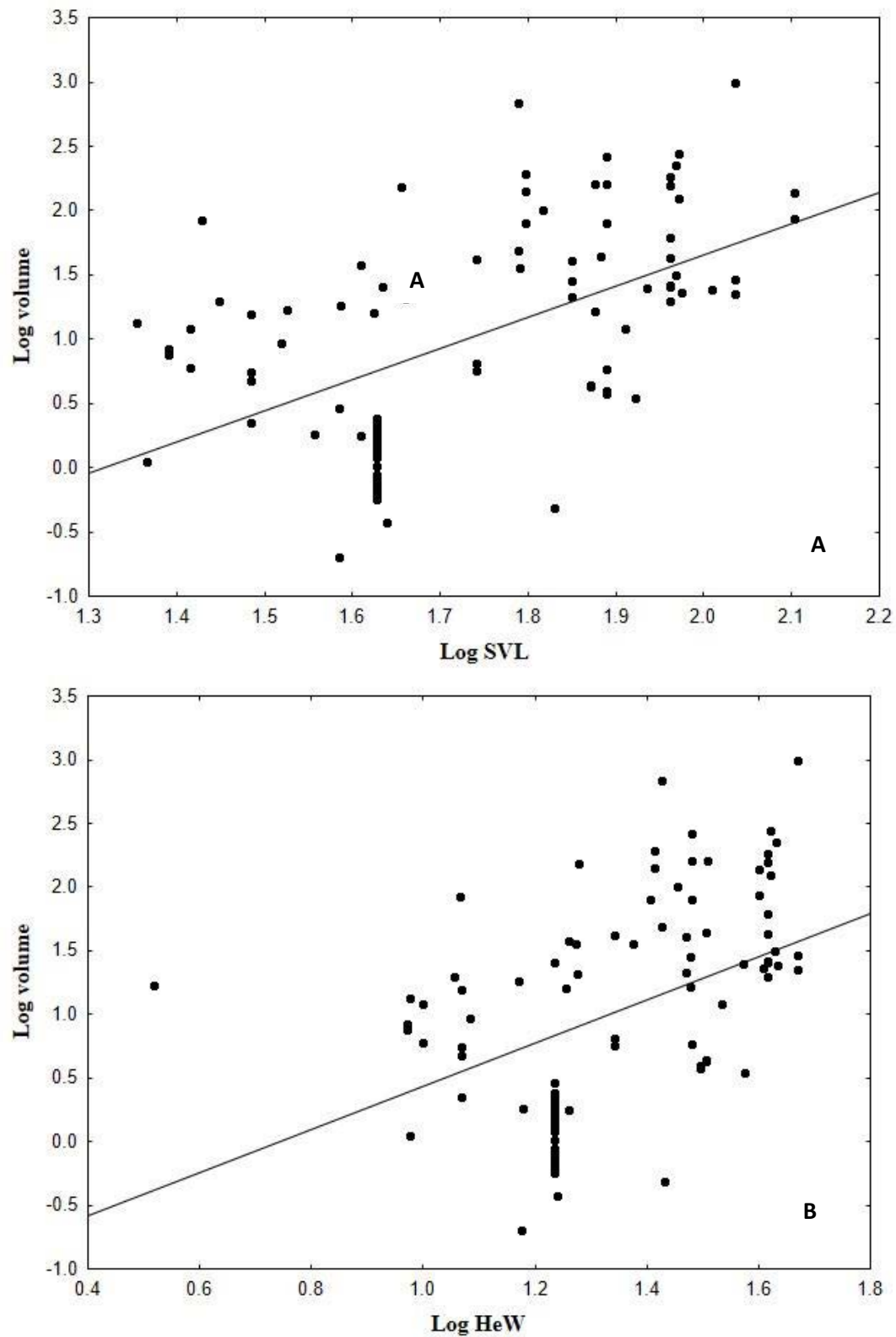


Figure 9. Correlation between frog size and prey volume in *Bokermannohyla alvarengai*: snout-vent length (SVL) vs. volume prey (A); head width (HeW) vs. volume prey (B). Measurements of SVL and HeW in millimeters (mm).



Figure 10. Male of *Bokermannohyla alvarengai* with scars and injuries probably resulted from a male-male combat.

Fighting is expensive in terms of time, energy and risk of injury, reasons that most animals tend to settle indirect disputes for females with vocal competition and only rarely fight (Lutz, 1960; Wells, 1977a; Robertson, 1986). However, as the female has the choice, with the oldest, largest and/or most aggressive male obtaining the greatest number of mates (cf. Wells, 1977b; Kluge, 1981), the costs of combats appear to be compensated by the reproductive success in some species. Although the factual occurrence of male-male combats in *B. alvarengai* are yet to be confirmed, their SSD, prepollex skeletal structure and high frequency of wounding during the reproductive period indicate as highly probable that aggressive interactions between males does occur in this species.

Bokermannohyla alvarengai is a skittish treefrog ceasing all activities at the slightest disturbance, making it difficult to observe reproductive behaviors, a problem already mentioned by Sazima and Bokermann (1977), and Eterovick and Sazima (2000). Indeed, besides the lack of witness of any combat for mates in the species, only few males in vocalization activity were registered (only 12 during the study period) as well as only one part of the courtship behavior. This highlight the difficult in describing some features about the reproduction patterns in *B. alvarengai*, like the mating system and territoriality, for example. Despite we believe that the sequence on the courtship behavior observed in this study is a valid description of the pre-mating courtship of *B. alvarengai* (details on Appendix 1), information about the type of amplexus and time during oviposition in this species are still unknown. Nevertheless, the male of that reproductive event showed fidelity to its particular calling site for the next three nights, suggesting territoriality. According to Wells (1977a), males of prolonged breeders usually are territorial, and maintaining a territory results in several advantages that will increase the chances of obtaining mates. Our results on habitat use patterns of both sexes (see chapter 2)

lend greater weight to this assumption about *B. alvarengai*. Moreover, as males are supposed to be aggressive frogs as commented below, and this feature is closely related to territoriality in anurans (Wells, 1977b; Kluge, 1981), *B. alvarengai* is expected as a territorial species.

The reproductive cycle of *B. alvarengai* is one of the most typical and generalized in anurans, characterized by aquatic eggs that develop into exotrophic aquatic tadpoles that, in turn, metamorphose into four-legged terrestrial frogs (Haddad and Prado, 2005). This study confirms the calling and oviposition sites previous reported for the species but our data extended its reproductive period, which is not restricted to the rainy season (see Sazima and Bokermann, 1977; Eterovick and Sazima, 2004). The record of a calling male in July, a clutch registered in August, as well as tadpoles found in May indicate that adults may be sexually active from July to January, since the larvae develops in four months (cf. Eterovick and Sazima, 2004). Despite pregnant females were observed in all seasons, females with advanced gonad maturation stages (i.e. ready for egg-laying) were recorded only during the early wet. The high value of gonad index in this season was already expected considering that females invest more energy in reproduction in gonad mass for oviposition (higher percentage of body mass allocated in gonad). However, differently from the females, males presented the highest gonad index during the early dry season, suggesting high testicular activity before the reproduction period. Testes of anurans increase in size and weight during spermatogenesis (Duellman and Trueb, 1994), and this stage may precede considerably the mating season. Because one calling male was recorded in July (just after the early dry), it is possible that males prepare themselves investing in testes mass for sperm production previously to the beginning of the breeding season.

Ovarian size factor is highly variable within anurans and may reflects differences in reproductive strategies (Perotti, 1997). A reproductive strategy may be viewed as the combination of physiological, morphological, and behavioral attributes that act in concert to produce the optimal number of offspring under certain environmental condition (Duellman and Trueb, 1994). For example, in case of species with terrestrial oviposition site there is a selective advantage to increase in size in order to increase fecundity, whereas in species that place eggs in water usually presents larger clutches (Crump, 1974). In general, OSF increases together with the increase of female SVL but this relation is dependent of the reproductive mode. According to Hödl (1990), species with aquatic eggs have by far the largest ovarian complements. However, the index found for *B. alvarengai* (29.87) is considerably low as compared with that for other anuran species of the same reproductive mode as some leptodactylids (e.g. *Leptodactylus chaquensis*: 116.96, and *Physalaemus biligonigerus*: 120.08,

Perotti, 1997), ranids (e.g. *Lithobates catesbeianus*: 74.83, Kaefer et al., 2007), and bufonids (e.g. *Rhinella fernandezae*: 162.5, Basso, 1990), and slightly higher comparing to the hylids *Hyla parviceps* (13.38, Duellman and Crump, 1974) and *Pseudis minuta* (10.5, Melchior et al., 2004) (see Crump, 1974 for revision). This result places *B. alvarengai* as an intermediary fecundity species.

Fecundity advantage hypothesis, proposed by Darwin (1874), may be one of the responsible factors in the existence of differences in fecundity between species, since larger females have higher capacity of eggs storage. In fact, despite the size-fecundity relationships among anurans are highly variable, there is a tendency for larger oocytes and number of eggs with the increase of body size (Crump, 1974; Jorgensen, 1992; Duellman and Trueb, 1994). Nevertheless, besides size, environmental conditions are also pointed as a great influence in oocytes production (Solano, 1987; Lemckert and Shine, 1993). Rainfall and the subsequent availability of water bodies are probably the most important environmental factors influencing anuran reproduction (Hödl, 1990), but other ecological forces like predation pressure may also be considered in this context. *Bokermannohyla alvarengai* breeds in temporary streams with rocky bottom, laying eggs as a loose aggregate clutch generally attached to the bottom in relatively shallow and visible spots. Despite only one record about oophagy by conspecific tadpoles is available (e.g. São Pedro et al., 2008), clutches of *B. alvarengai* are high susceptible to several predators. In addition to conspecific cannibalism or obligate larval oophagy by other anuran species, predation of eggs by aquatic insects seems to be high in the species (pers. obs.). It is known that tadpoles of *B. alvarengai* are also preyed upon by aquatic insects and visually oriented terrestrial vertebrates in montane meadow streams (Eterovick et al., 2010; e.g. Eterovick and Barata, 2006; Kopp and Eterovick, 2006). Therefore, it is possible that predation pressure over eggs and larvae in the species constitutes a great influence in oocytes production. Furthermore, the male-biased in SSD (commented below) coupled with the expected absence of clutch attendance by adults may be another components that drive the fecundity in *B. alvarengai*.

Main factors influencing the diet and feeding habits of amphibians are seasonal abundance of food, size and shape constraints, and also ecological tolerances (Duellman and Trueb, 1994). Most anurans are generalist feeders on a variety of invertebrates with the composition determined mainly on body size and microhabitat (Toft, 1980, 1981, 1985). The qualitative and quantitative analysis of the diet of *B. alvarengai* also revealed generalist habits for the species, proving the ability to utilize a wide variety of prey taxa. In general, hylids eat fewer prey items possibly as a consequence to have smaller niche breadths than terrestrial

anurans (Parmelee, 1999). However, considering that *B. alvarengai* is a terrestrial treefrog, the diverse diet observed in the species may be an outcome of the microhabitat.

Although invertebrates seem to constitute the primary food source, amphibians are considered to be feeding opportunists and vertebrates can be part of their diet (Duellman and Trueb, 1994; Wells, 2007). Some large anurans of the families Ceratophryidae, Leptodactylidae, and Ranidae are known to prey on vertebrates, and this peculiarity seems to be related with aggressive species. However, considering that we found only one non-invertebrate in the pool sampled, *B. alvarengai* may be an opportunistic feeder instead a vertebrate predator. In fact, several anurans are supposed to be feeding opportunists consuming prey in response to the environmental availability (e.g. Johnson and Bury, 1965; Oplinger, 1967; Labanick, 1976; Hirai and Matsui, 1999, 2000), and as predicted by optimal foraging theory (cf. MacArthur and Pianka, 1966), this strategy seems to be the best foraging tactic to cope with temporal fluctuations in prey diversity, activity, and availability (Gadsen and Palacios-Orona, 1997). However, only based on comparisons between frog's diet composition and prey availability that it is possible to classify a species as an opportunistic predator (cf. Hirai and Matsui, 2000). Therefore, the lack of prey availability in the environment in this study precludes inferences about opportunism in *B. alvarengai*.

Variation in the taxonomic composition of diet with the growth stage is expected as a passive side effect of the capacity to ingest larger prey, and the ontogenetic variation can be as large as or larger than interspecific differences (Lima, 1998; Lima and Magnusson, 1998). In fact, ontogenetic shifts in prey size are a general phenomenon among amphibians, and the strength of this relationship is more pronounced in species with large differences in body size from metamorphosis to adult stage (Whitfield and Donnelly, 2006). However, a shift in prey type seems to be significant only in species that have a small variation in body size during ontogeny (cf. Whitefield and Donnelly, 2006). Thus, considering that *B. alvarengai* has a great range on SVL varying from 15.80 (size of newly metamorphosed froglets) to 126.63 mm, a great shift in prey size instead prey type could be expected.

As recorded for other anurans (e.g. Lima and Moreira, 1993; Giaretta et al., 1998), *B. alvarengai* increased in relative values its use of large prey with ontogeny. Four categories were preyed only by adults that, excluding Acari that probably configured an accidental uptake, could be due the incapacity of juveniles in subjugate these large prey taxa. Furthermore, the occurrence of categories only in the diet of juveniles (small category of preys) would indicate ontogenetic change in electivity for prey type, independent of the prey size. However, evaluating the I_x in the species instead just the diet composition, the shift with ontogeny seems

to be not very expressive. Despite termites being the most consumed item and the category with the highest I_x in juveniles, only three animals showed this prey type in the sample (occurrence frequency of 4.6%) of which one single individual was responsible for 30 termites, indicating, therefore, a possibility of a bias in the result. That is, termites had low consumption in the diet of *B. alvarengai*, and excluding this prey category of the analysis, same trend of I_x was observed between juveniles and adults. Likewise, small items still were found in the diet of adults indicating that small preys could worth the energy to pursue in both stages.

A correlative relationship between predator and prey size was demonstrated for most major groups of vertebrates (Hespenheide, 1973), including anurans since they tend to ingest the prey whole (Lima and Moreira, 1993; Duellman and Trueb, 1994). As observed for other species (Lima, 1998; Lima and Magnusson, 2000; Maneyro et al., 2004; Maragno et al., 2011; Guimaraes et al., 2011), a positive correlation between the size (SVL and head width) of *B. alvarengai* and prey volume was found in this study, even considering small preys in the diet of adults. The size selection is often related to the optimal allocation of time spent searching for, and handling prey (Werner and Hall, 1974), but also should be correlated with frequency of feeding (Duellman and Lizana, 1994). In other words, if large preys are not available, animals will ingest smaller and more abundant preys until find a larger one. This behavior can be likened to a habit of surviving on numerous small snacks between infrequent feasts (Duellman and Lizana, 1994). For instance, even considering that many arboreal hylids avoid eating ants (cf. Parmelee, 1999), this category of prey, considered small for the species, is relative common in the diet of *B. alvarengai*.

In addition to morphological constraints, foraging behavior has a great influence on diet and is considered a mechanism that also determines the differences in prey type and size. It is classified in two modes: the sit-and-wait foragers and species that are active strategists (Huey and Pianka, 1981; Toft, 1981). In general, species that forage actively eat small and slow prey that occurs in aggregations (e.g. ants, mites, termites), whereas sit-and-wait foragers eat large and normally solitary prey (e.g. beetles, orthopterans, spiders) (Toft, 1985; Strussmann et al. 1984). According to Parmelee (1999), most hylids are sit-and-wait predators, often relying on crypsis to ambush prey, and evaluating the composition of prey items most consumed by *B. alvarengai*, the species seems to be characterized as a sit-and-wait strategist.

Acknowledgements. We thank ICMBio for the permit to collect animals (SISBIO, 22170-1/2010), and Parque Nacional da Serra do Cipó (PNSC) for research assistance. We also thank P.C.A. Garcia, L.F. Toledo, H. Zaher, and C.F.B Haddad for allowing the access to specimens under their care. Financial support was provided by FAPESP (grants 2009/15712-0; 2010/05473-6).

REFERENCES

- Ab'Saber, A.N. (1977). Os domínios morfoclimáticos na América do Sul. Primeira aproximação. *Geomorfologia* 52:1–21.
- Barber, B.J. & Blake, N.J. (2006). Reproductive physiology. *Dev Aquac Fish Sci* 35:357–416.
- Bertoluci, J. & Silvano, D. (2010). *Bokermannohyla alvarengai*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.1. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 22 July 2014.
- Bokermann, W.C.A. (1964). Dos novas espécies de *Hyla* de Minas Gerais y notas sobre *Hyla alvarengai* Bok. (Amphibia, Salientia-Hylidae). *Neotropica* 10:67–76.
- Brattstrom, B.H. (1979). Amphibian temperature regulation studies in the field and laboratory. *Am Zool* 19(1):345–356.
- De La Riva, I. (1994). A new aquatic frog of the genus *Telmatobius* (Anura: Leptodactylidae) from Bolivian cloud forests. *Herpetologica* 50(1):38–45.
- Cadle, J.E. (1995). A new species of *Boophis* (Anura: Rhacophoridae) with unusual skin glands from Madagascar, and a discussion of variation and sexual dimorphism in *Boophis albilabris* (Boulenger). *Zool J Linn Soc* 115(4):313–345.
- Crump, M.L. (1974). Reproductive strategies in a tropical anuran community. *Misc Publ Mus Nat Hist, University of Kansas* 61:1–68.
- Duellman, W.E. (1970). Hylid frogs of Middle America. *Monogr Mus Nat Hist, University of Kansas* 1–2:1–753.
- Duellman, W.E. & Crump, M.L. (1974). Speciation in frogs of the *Hyla parviceps* group in the upper Amazon basin. *Mus Nat Hist, University of Kansas* 23:1–40.
- Duellman, W.E. & Lizana, M. (1994). Biology of a sit-and-wait predator, the leptodactylid frog *Ceratophrys cornuta*. *Herpetologica* 51–64.
- Duellman, W.E & Trueb, L. (1994). *Biology of amphibians*. New York: McGraw-Hill Book Company.

- Eiten, G. (1978). Delimitation of Cerrado concept. *Vegetatio* 36:169–178.
- Eterovick, P.A. & Sazima, I. (2000). Structure of an anuran community in a montane meadow in southeastern Brazil: effects of seasonality, habitat, and predation. *Amphibia-Reptilia* 21:439–461.
- Eterovick, P.A. & Sazima, I. (2004). *Anfíbios da Serra do Cipó, Minas Gerais – Brasil*. Belo Horizonte: PUC Minas.
- Eterovick, P.C., Oliveira, F.F. & Tattersall, G.J. (2010). Threatened tadpoles of *Bokermannohyla alvarengai* (Anura: Hylidae) choose backgrounds that enhance crypsis potential. *Biol J Linn Soc* 101(2):437–446.
- Fabrezi, M. (2001). A survey of prepollex and prehallux variation in anuran limbs. *Zool J Linn Soc* 131(2):227–248.
- Faivovich, J. Haddad, C.F.B., Garcia, P.C.A., Frost, D.R., Campbell, J.A. & Wheeler, W.C. (2005). Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hyalinae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bull Am Mus Nat Hist* (294):6–228.
- Giulietti, A.M., Menezes, N.L., Pirani, J.R., Meguro, M. & Wanderley, M.G.L. (1987). Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Caracterização e lista de espécies. *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo* 9:1–152.
- Giulietti, A.M. (1996). Flora: diversidade, distribuição geográfica e endemismos. In: Fernandes, G.W. (Ed.). *Serra do Cipó: ecologia e evolução*, pp. 84–100. Rio de Janeiro: Vozes.
- Guimarães, T.C., Figueiredo, G.B., Mesquita, D.O. & Vasconcellos, M.M. (2011). Ecology of *Hypsiboas albopunctatus* (Anura: Hylidae) in a neotropical savanna. *J Herpetol* 45(2):244–250.
- Haddad, C.F. & Prado, C.P. (2005). Reproductive modes in frogs and their unexpected diversity in the Atlantic Forest of Brazil. *BioScience*, 55(3):207–217.
- Hartmann, M.T., Hartmann, P.A. & Haddad, C.F. (2010). Reproductive modes and fecundity of an assemblage of anuran amphibians in the Atlantic rainforest, Brazil. *Iheringia, Série Zoologia* 100(3):207–215.
- Hespenheide, H.A. (1973). Ecological inferences from morphological data. *Annu Rev Ecol Syst* 4(1):213–229.
- Heyer, W.R., Rand, A.S., Cruz, C.A.G.D., Peixoto, O.L. & Nelson, C.E. (1990) *Frogs of Boraceia*. *Arq Zool* 31(4):231–410.
- Heyer, W.R. (1999). A new genus and species of frog from Bahia, Brazil (Amphibia: Anura: Leptodactylidae) with comments on the zoogeography of the Brazilian campos rupestres. *Proc Biol Soc Wash* 112(1):19–39.
- Howard, R.D. (1981). Sexual dimorphism in bullfrogs. *Ecology* 62(2):303–310.

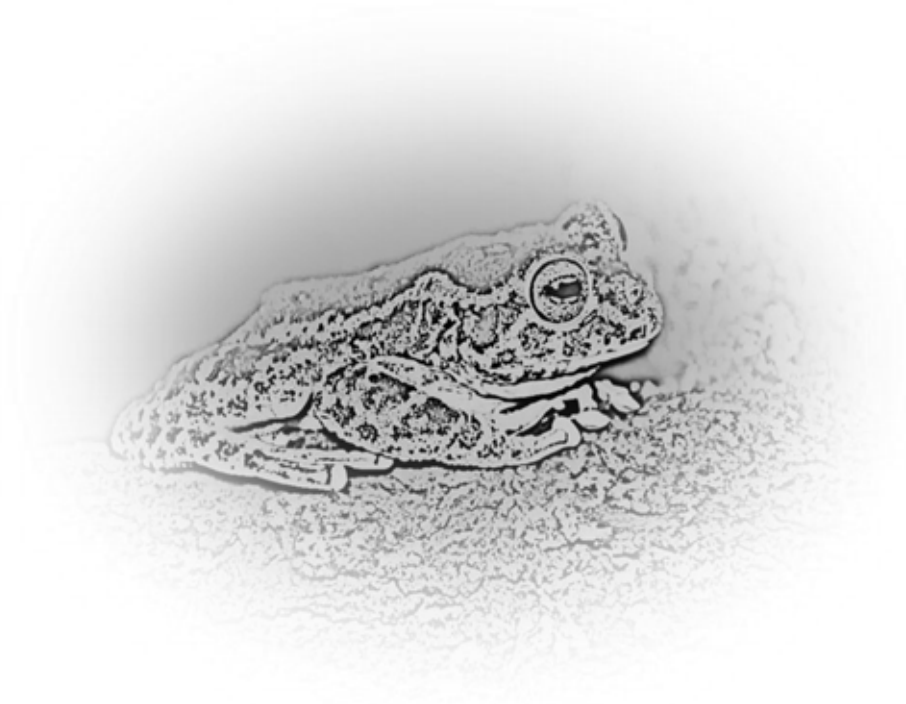
- Huey, R.B. & Pianka, E.R. (1981). Ecological consequences of foraging mode. *Ecology* 62(4):991–999.
- Jameson, D.L. (1966). Rate of weight loss of tree frogs at various temperatures and humidities. *Ecology* 47(4), 605–613.
- Jorgensen, C.B. (1992). Growth and reproduction. In: Feder, M.E. & Burggren, W.W. (Ed.). *Environmental Physiology of the Amphibians*, pp. 439–66. Illinois: Univ. Chicago Press. Chicago.
- Kluge, A. G. (1981). The life history, social organization, and parental behavior of *Hyla rosenbergi* Boulenger, a nest-building gladiator frog. *Misc Publ Mus Zool, University of Michigan* 160:1–151.
- Köppen, W. (1900). Versuch einer Klassifikation der Klimate, vorzugsweise nach ihren Beziehungen zur Pflanzenwelt. *Geographische Zeitschrift* 6(11):593–611.
- Legler, J.M. & Sullivan, L.J. (1979). The application of stomach-flushing to lizards and anurans. *Herpetologica* 35:107–110.
- Leite, F.S.F., Pezzuti, T.L. & Drummond, L.O. (2011). A new species of *Bokermannohyla* from the Espinhaço Range, State of Minas Gerais, Southeastern Brazil. *Herpetologica* 67:440–448.
- Leite, F.S.F., Pezzuti, T.L. & Garcia, P.C.A. (2012). A new species of the *Bokermannohyla pseudopseudis* group from the Espinhaço Range, Central Bahia, Brazil (Anura: Hylidae). *Herpetologica*, 68(3):401–409.
- Lima, A.P. (1998). The effects of size on the diets of six sympatric species of postmetamorphic litter anurans in Central Amazonia. *J Herpetol* 32(3):392–399.
- Lima, A.P. & Magnusson, W.E. (2000). Does foraging activity change with ontogeny? An assessment for six sympatric species of postmetamorphic litter anurans in central Amazonia. *J Herpetol* 34(2):192–200.
- Lugli, L. & Haddad, C.F.B. (2006). A new species of the *Bokermannohyla pseudopseudis* group from central Bahia, Brazil (Amphibia, Hylidae). *Herpetologica* 62:453–465.
- Lutz B. (1960). Fighting and an incipient notion of territory an male tree frogs. *Copeia* 1:61–63.
- Maneyro, R., Naya, D.E., Rosa, I.D., Canavero, A. & Camargo, A. (2004). Diet of the South American frog *Leptodactylus ocellatus* (Anura, Leptodactylidae) in Uruguay. *Iheringia, Série Zoologia* 94(1):57–61.
- Maragno, F.P. & Souza, F.L. (2011). Diet of *Rhinella scitula* (Anura, Bufonidae) in the Cerrado, Brazil: the importance of seasons and body size. *Rev Mex Biodiversidad* 82(3):879–886.

- Oliveira, C.D. & Santos, L.R.D.S. (2004). Histological characterization of cellular types during *Scinax fuscovarius* oogenesis (Lutz)(Anura, Hylidae). *Rev Bras Zool* 21(4):919–923.
- Parmelee, J.R. (1999). Trophic ecology of a tropical anuran assemblage. *Nat Hist Mus, University of Kansas* 11:1–59.
- Perotti, M.G. (1997). Modos reproductivos y variables reproductivas cuantitativas de un ensamble de anuros del Chaco semiárido, Salta, Argentina. *Rev Chil Hist Nat* 70:277–288.
- Prado, C.P.A. & Haddad, C.F. (2003). Testes size in leptodactylid frogs and occurrence of multimale spawning in the genus *Leptodactylus* in Brazil. *J Herpetol* 37(2):354–362.
- Prado, C.P.A. & Haddad, C.F.B. (2005). Size-fecundity relationships and reproductive investment in female frogs in the Pantanal, south-western Brazil. *Herpetol J* 15(3):181–189.
- Robertson, J.G. (1986). Male territoriality, fighting and assessment of fighting ability in the Australian frog *Uperoleia rugosa*. *Anim Behav* 34(3):763–772.
- São Pedro, V.A., Drummond, L.O., Costa, H.C., Fernandes, V.D. & Feio, R.N. (2008). Predação de embriões por girinos de *Bokermannohyla alvarengai* (Anura, Hylidae) em riacho temporário na Serra do Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil. *Boletim do Museu de Biologia Melo Leitão*, 24:111–118.
- Sazima, I. & Bokermann, W.C.A. (1977). Anfíbios da Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil. 3, Observações sobre a biologia de *Hyla alvarengai* Bok. (Anura, Hylidae). *Rev Bras Biol* 37:413–417.
- Shine, R. (1979). Sexual selection and sexual dimorphism in the Amphibia. *Copeia* (2):297–306.
- Shoemaker, V.H., Hillman, S.S., Hillyard, S.D., Jackson, D.C., McClanahan, L.L., Withers, P.C. & Wygoda, M.L. (1992). Exchange of water, ions, and respiratory gases in terrestrial amphibians. In: Feder, M.E. & Burggren, W.W. (Ed.). *Environmental Physiology of the Amphibians*, pp. 125–150. Chicago: The University of Chicago Press.
- Solé, M., Beckmann, O., Pelz, B., Kwet, A. & Engels, W. (2005). Stomach-flushing for diet analysis in anurans: an improved protocol evaluated in a case study in Araucaria forests, southern Brazil. *Stud Neotrop Fauna E* 40(1):23–28.
- Strüssmann, C., Vale, M.B.R., Meneghini, M.H. & Magnusson, W.E. (1984). Diet and foraging mode of *Bufo marinus* and *Leptodactylus ocellatus*. *J Herpetol* 18(2):138–146.
- Tattersall, G.J., Eterovick, P.C. & Andrade, D.V. (2006). Tribute to R. G. Boutilier: Skin colour and body temperature changes in basking *Bokermannohyla alvarengai* (Bokermann 1956). *J Exp Biol* 209:1185–1196.

- Taylor, W.R. & VanDyke, G.C. (1985). Revised procedures for staining and clearing small fishes and other vertebrates for bone and cartilage study. *Cybio* 9:107–119.
- Toft, C.A. 1980. Feeding ecology of thirteen syntopic species of anurans in a seasonal tropical environment. *Oecologia* 45:131–41.
- Toft, C.A. (1981). Feeding ecology of Panamanian litter anurans: patterns in diet and foraging mode. *J Herpetol* 15(2):139–144.
- Toft, C.A. (1985). Resource partitioning in amphibians and reptiles. *Copeia* (1):1–21.
- Vanzolini, P.E. (1982). A new *Gymnodactylus* from Minas Gerais, Brazil, with remarks on the genus, on the area and on montane endemisms in Brazil (Sauria, Gekkonidae). *Pap Avulsos Zool* 34:403–413.
- Vitt, L. & Caldwell, J.P. (1994). Resource utilization and guild structure of small vertebrates in the Amazon forest leaf litter. *J Zool* 234(3):463–476.
- Wells, K.D. (1977). The social behaviour of anuran amphibians. *Anim Behav* 25:666–693.
- Wells, K.D. (2007). The ecology and behavior of amphibians. University of Chicago Press.
- Whitfield, S.M. & Donnelly, M.A. (2006). Ontogenetic and seasonal variation in the diets of a Costa Rican leaf-litter herpetofauna. *J Trop Ecol* 22:409–417.
- Woolbright, L.L. (1983). Sexual selection and size dimorphism in anuran amphibia. *Am Nat* 121(1):110–119.

CAPÍTULO II

Distribuição espaço-temporal de *Bokermannohyla alvarengai* (Anura: Hylidae) na Serra do Cipó, sudeste do Brasil



Distribuição espaço-temporal de *Bokermannohyla alvarengai* (Bokermann, 1956) na Serra do Cipó, sudeste do Brasil

RESUMO. Apesar do interesse biológico por ocorrer em áreas de altitude em campos rupestres e apresentar comportamento bastante incomum dentre os anuros, o hábito de assoalhar, a história natural de *Bokermannohyla alvarengai* permanece pouco conhecida, principalmente no que tange ao conhecimento da dinâmica espaço-temporal na espécie. Este estudo descreve a dinâmica de uma população de *B. alvarengai* na Serra do Cipó, estado de Minas Gerais, analisando os fatores que estruturam os padrões temporais e espaciais. Foi utilizado o método das transecções para análise dos padrões de atividade diária e sazonal, e preferências de macro e microambiente pela espécie. Para descrever os padrões de deslocamento e obter dados sobre a área de uso, a técnica do carretel de linha (*thread bobbin*) foi empregada. Apesar de comumente encontrada assoalhando durante o dia, a espécie é estritamente noturna. A sazonalidade não corrobora o padrão geral de anuros já que a abundância de indivíduos não variou entre as estações, não havendo correlação com variáveis climáticas. A espécie é bem adaptada à vida rupícola apresentando preferência pelos campos rochosos e substrato rocha, microambiente utilizado por cerca de 80% do total de animais. A taxa de deslocamento médio diário em 21 indivíduos rastreados pelos carretéis de linha foi de 25,3 m/dia com deslocamento diário máximo de 88,5 m, não sendo significativamente diferente entre os sexos e entre as estações. A área máxima de uso calculada foi de 856,6 m² e foi observada baixa sobreposição de área. Observamos uma tendência de menor deslocamento diário nas fêmeas com áreas de uso maiores, indicando que machos exploram de maneira mais intensa a área de uso (IUD), o que poderia ser um indício de territorialidade na espécie. O conhecimento da dinâmica espaço-temporal de populações de anfíbios e dos fatores que a estruturam são de grande importância em decorrência dos crescentes declínios globais. Este estudo, além de essencial para o conhecimento de informações biológicas básicas, pode contribuir para o delineamento de estratégias efetivas para a conservação da espécie.

INTRODUÇÃO

Conhecer a distribuição dos organismos no espaço e no tempo é fundamental para compreender processos ecológicos e evolutivos, além de primordial em estudos sobre a biologia da conservação. O modo como um animal utiliza o seu ambiente natural e os recursos

associados é requisito básico no entendimento das interações ecológicas, dinâmicas populacionais e pressões seletivas (Schoener, 1974; Simberloff e Dayan, 1991; Semlitsch, 2008). Vários estudos sobre a dinâmica espacial e temporal de anuros foram realizados com o intuito de investigar a coexistência entre populações interespecíficas (e.g. Cardoso et al., 1989; Heyer et al., 1990; Bertolucci, 1991; Haddad e Sazima, 1992; Rossa-Feres e Jim, 1994; Pombal Jr, 1997; Eterovick e Sazima, 2000), mas estes aspectos também são de suma importância na caracterização da ecologia básica de uma espécie. Estudos sobre a dimensão espaço-temporal das populações de animais permitem descrever as interações entre animal e meio, avaliar aspectos comportamentais, assim como identificar os fatores que regulam a distribuição dos indivíduos.

Tradicionalmente, muitos ecologistas têm assumido que os processos ecológicos mais importantes que afetam populações e comunidades operam em escalas espaciais locais (Dunning et al., 1992), ou seja, o arranjo espacial dos recursos em uma determinada paisagem influencia profundamente a distribuição das espécies (ver Ricketts, 2001). Os principais fatores apontados como reguladores da distribuição espaço-temporal dos organismos podem ser abióticos como o clima, geografia, solo e salinidade, ou ainda bióticos como vegetação, estrutura da comunidade e disponibilidade local de recursos tróficos (Aichinger, 1987; Berven, 1990; Beebe, 1995; Brown et al., 2009). Na região tropical, os padrões de distribuição e abundância dos anfíbios são principalmente considerados como funções de variação das condições climáticas, altitude, estrutura vegetacional e ciclos reprodutivos (Crump, 1971; Duellman, 1988).

A distribuição temporal de uma espécie pode ser analisada em termos de atividade diária e sazonalidade, enquanto que para investigar a ocupação no espaço é necessário avaliar os padrões de movimentação e quantificar e interpretar a área de vida e eventual territorialidade. Os deslocamentos dos indivíduos fornecem as informações necessárias sobre como os animais utilizam o ambiente, incluindo os padrões de atividade, migração, dispersão e uso de recursos (Sinsch, 1990; White e Garrot, 1990; Semlitsch, 2008). Além disso, fornecem informações sobre preferências de macro e microambiente e, se adequadamente definidos, estudos sobre o uso do espaço podem fornecer ainda informações valiosas sobre as exigências ecológicas das espécies (White e Garrot, 1990).

O estudo da movimentação em anfíbios, no entanto, tem se revelado uma tarefa não trivial devido principalmente às limitações metodológicas. De acordo com Heyer et al. (1994), a maior dificuldade em se estudar o grupo é a capacidade de re-localização de indivíduos, especialmente em se tratando de espécies conspicuas. Alguns métodos de rastreamento foram

propostos e têm sido amplamente utilizados no monitoramento de animais permitindo maior conhecimento sobre o uso do ambiente. Dentre eles, a rádio-telemetria é bastante difundida em estudos de distribuição espacial já que monitora com precisão os movimentos dos animais. Entretanto, apesar de investigar o uso do microambiente em fina escala e determinar áreas de vida, padrões de deslocamento e atividade diária e sazonal, a principal restrição ao rastreamento de anfíbios por rádio-telemetria é o tamanho e a massa do transmissor (Richards et al., 1994). Além do mais, visto que a rádio-telemetria utiliza a distância linear entre pontos consecutivos, a técnica pode subestimar de forma significativa a movimentação dos animais (Lemckert e Brassil, 2000; Forester et al., 2006; Tozetti e Martins, 2007).

A técnica do carretel de linha pode ser vista como alternativa ao rastreamento pela rádio-telemetria permitindo detalhamento dos movimentos e uso do microambiente por menos esforço e perturbação aos animais (Dole, 1965; Miles et al., 1981; Lemckert e Brassil, 2000; Tozetti e Toledo, 2005). Constitui uma técnica simples, eficaz e de baixo custo que, além de fornecer informações valiosas sobre o padrão de deslocamento e uso do microambiente, é capaz de mensurar a intensidade do uso do espaço e a dimensão da área de vida diária das espécies (Tozetti e Toledo, 2005; Delciellos et al., 2006). A técnica tem sido comumente utilizada em estudos dos padrões de uso do ambiente especialmente em pequenos mamíferos (e.g. Key e Wood, 1996; Cunha e Vieira, 2002; Moura et al., 2005; Vieira et al., 2005; Steinwald et al., 2006), mas também já foi aplicada em outros grupos como quelônios (e.g. Stott, 1987; Carter et al., 2000), serpentes (e.g. Shiau et al., 2004; Tozetti et al., 2009), e ainda invertebrados (e.g. Pearce, 1990; Schlacher e Lucrezi, 2010). Em anfíbios, o método já foi empregado para avaliar alguns parâmetros do uso do ambiente (e.g. Dole, 1965; Dole, 1967; Dole, 1968; Grubb, 1970; Dole, 1972; Sinsch, 1988a,b; Duellman e Lizana, 1994; Seebacher e Alford, 1999; Lemckert e Brassil, 2000; Somaweera e Shine, 2001; Tozetti e Toledo, 2005; Forester et al., 2006), mas apresenta o inconveniente de ser restrito a espécies de maior porte.

Compreender como os animais utilizam o ambiente também é crucial em diversos aspectos de gestão e conservação de anuros (Dodd e Cade, 1998; Gibbs 1998; Lemckert e Brassil, 2000; Bulger et al., 2003; Lemckert, 2004; Blihovde, 2006; Gamble et al., 2007; Nathan, 2008) tais como disseminação de doenças emergentes, proliferação de espécies invasoras, impacto do uso do solo e ainda respostas às mudanças climáticas (Semlitsch, 2008). De fato, estratégias de conservação eficazes requerem informação detalhada de como os animais utilizam o ambiente para que se possa identificar a vulnerabilidade das espécies à perturbações, verificar a eficácia de reintroduções e definir o tamanho e localização de áreas a serem protegidas (Webb e Shine, 1998). Este quadro salienta a necessidade de aprofundar

estudos neste campo, face ao declínio global de espécies, em grande parte devido a pressões de natureza antropogênica sobre os ecossistemas (Gibbons et al., 2000).

No presente estudo, são apresentadas informações abrangentes sobre a ecologia espacial e temporal de um anfíbio de altitude, *Bokermannohyla alvarengai* (Bokermann, 1956). Esta espécie apresenta distribuição restrita aos campos rupestres, fitofisionomia do Cerrado que ocorre acima de 1000 m de altitude. O aspecto mais marcante observado em *B. alvarengai* é o prolongado comportamento de assoalhar (*basking behaviour*), considerado pouco comum entre os anfíbios em função do alto risco de desidratação (cf. Jameson, 1966; Hutchison e Dupré, 1992; Shoemaker et al., 1992). Apesar de configurar uma espécie de altíssimo interesse biológico por ocorrer em áreas de altitude no Brasil e devido ao seu comportamento peculiar de assoalhamento, dados sobre sua história natural permanecem pouco explorados. A espécie foi descrita por Werner Bokermann em 1956 e poucas informações sobre sua biologia foram acrescentadas desde então (e.g. Bokermann, 1964; Sazima e Bokermann, 1977; Eterovick e Sazima, 2004; Tattersall et al., 2006; São Pedro et al., 2008; Eterovick et al., 2010).

Aqui, fornecemos dados sobre os componentes envolvidos na dimensão espaço-temporal de *B. alvarengai* como período de atividade diária e sazonalidade, e a forma como a espécie utiliza o ambiente incluindo distribuição macroespacial, preferências de microambiente, padrões de deslocamento e área de uso. Também discutimos sobre as implicações dos padrões de atividade e seleção do ambiente na ecologia termal da espécie visando a compreensão de como os animais lidam com as condições ambientais adversas dos campos rupestres. Além de gerar conhecimento sobre os padrões de distribuição da espécie no espaço e no tempo, este estudo pode contribuir para o delineamento de estratégias efetivas para a conservação de *B. alvarengai* na Serra do Cipó, ambiente atualmente sujeito a um impacto potencial das atividades de turismo e ocupação humana (cf. Eterovick et al., 2009).

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

O estudo foi conduzido na Serra do Cipó (19°12' a 19°20'S, 43°30' a 43°40'O), localizada ao sul da cadeia do Espinhaço, estado de Minas Gerais, Brasil. A altitude varia desde ca. 900 a 1250 m acima do nível do mar e é predominantemente coberta por vegetação herbácea e arbustiva, com árvores esparsas de pequeno porte (Joly, 1970; Giuliatti et al., 1987). O relevo é fortemente acidentado, com solo arenoso, raso, ácido, pobre em nutrientes e matéria orgânica,

caracterizado pelos grandes afloramentos rochosos (Giulietti et al., 1987). A Serra do Cipó está incluída nos domínios do bioma Cerrado (Ab'Saber, 1977; Eiten, 1978), e em altitudes superiores a 1000 m é caracterizada, na maior parte, pela presença de campos rupestres, formação particularmente rica em espécies endêmicas (Giulietti, 1996). Segundo a classificação climática de Köppen (Köppen, 1900), a região apresenta clima mesotérmico (Cwb) com estações bem definidas. A alta sazonalidade é marcada com períodos chuvosos ocorrendo entre outubro e março e períodos de seca entre abril e setembro (ver detalhes em capítulo 1).

Coleta de dados

A amostragem foi realizada entre maio de 2011 e fevereiro de 2013 em oito campanhas com duração de aproximadamente 15 dias cada e intervalo de três meses, de modo a amostrar equitativamente todas as estações do ano. Para a coleta dos dados, foram utilizadas transecções lineares previamente estabelecidas conforme método proposto por Jaeger (1994). As transecções foram realizadas de forma sistemática caminhando-se lentamente à procura dos animais, observando-se todos os microambientes visualmente acessíveis e frestas de rochas. Três transecções de 1 km de comprimento cada foram criadas em ambientes de características distintas em termos de fitofisionomia, solo e condições topográficas (Figura 1).

Transecção 1 (T1): Campo aberto

Delimitada em área predominantemente de campo aberto, caracterizado por relevo plano e presença marcante de gramínea. Em alguns trechos há o aparecimento de ilhas de rochas com vegetação mais densa tomadas por canela de ema, arbustos e árvores esparsas. Nestes trechos o solo se torna mais pedregoso/arenoso.

Transecção 2 (T2): Riacho

Transecção delimitada ao longo de um riacho de largura e profundidade variáveis, com formação de poços e quedas d'água. Leito varia de rochas grandes a assoalho pedregoso. Em alguns trechos é encaixado em vale sendo acompanhado por morros com vegetação densa ou ilhas de rochas. A vegetação ao redor pode ser rala dominada por capim, canela de ema e herbáceas em algumas porções, e composta por vegetação arbustiva-arbórea densa em outras. Em algumas regiões há o adensamento da vegetação cobrindo o riacho.

Transecção 3 (T3): Campo rochoso

Disposta em campo rochoso a transecção apresenta relevo fortemente acidentado com vegetação densa composta por herbáceas e arbustos. Árvores em abundância, entremeadas por grandes blocos de rochas.

Cada transecção foi percorrida uma vez por estação do ano (outono, inverno, primavera e verão) em quatro períodos distintos do dia: madrugada (entre 00:01 e 06:00hs), manhã (entre 06:01 e 12:00hs), tarde (entre 12:01 e 18:00hs) e noite (entre 18:01 e 00:00hs). O tempo total gasto em cada percurso foi registrado, assim como condições do céu (aberto, encoberto, parcialmente encoberto) e ocorrência de chuvas. No início e ao término de cada percurso foram obtidas temperatura do ar, umidade relativa, velocidade do vento e luminosidade. Apesar dos esforços na padronização, o tempo de amostragem entre as transecções, períodos do dia e estações do ano foi variável e, portanto, o esforço amostral e a taxa de captura foram medidos em horas-pessoa de busca.



Figura 1. Disposição das transecções na área de estudo, com detalhes dos tipos de ambientes amostrados. **A.** Campo aberto (T1); **B.** Riacho (T2); e **C.** Campo rochoso (T3).

Os padrões de atividade diária da espécie foram avaliados com base no tipo de atividade de cada indivíduo capturado durante as transecções. A sazonalidade foi avaliada com base na abundância total de indivíduos registrados entre as estações. Para caracterização do uso do microambiente, o tipo de substrato em que o animal se encontrava foi registrado: rocha, vegetação, solo e água (Figura 2). Para averiguar o macroambiente mais ocupado pela espécie e, conseqüentemente, o preferido, os diferentes tipos de ambientes amostrados nas transecções (campo aberto, riacho e campo rochoso) foram comparados.

A cada encontro de espécimes as seguintes informações foram registradas: data e horário do encontro, coordenada geográfica, altitude, temperatura do ar, umidade relativa, velocidade do vento, luminosidade, orientação do indivíduo em relação ao sol, temperatura corpórea e do substrato (termômetro de leitura à distância por emissão de infravermelho), proximidade a corpos d'água, dados morfométricos (ver descrição das 18 variáveis em capítulo 1), massa corpórea (g), e determinação da faixa etária/sexo (juvenil, fêmea ou macho). Os indivíduos capturados foram marcados por amputação de artelhos conforme técnica de Donnelly et al. (1994), com adaptações.



Figura 2. Indivíduos de *Bokermannohyla alvarengai* utilizando diferentes substratos na Serra do Cipó. A. rocha; B. solo; C. vegetação; D. água.

Para avaliar os padrões de deslocamento e obter dados sobre a área de uso em *B. alvarengai*, a técnica de carretel de linha (*thread bobbin*; Dole, 1965) foi utilizada. Os carretéis (dimensão: 37 mm de comprimento e 14 mm de diâmetro; Hiltex Indústria e Comércio de Fios Ltda.) foram fixados externamente ao corpo dos indivíduos com o auxílio de elástico de acordo com Tozetti e Toledo (2005) (Figura 3), sendo que o dispositivo não ultrapassou 10% da massa corpórea do animal (cf. Heyer, 1994; Richards et al., 1994). Devido à essa limitação, somente foram utilizados indivíduos adultos com comprimento rostro-cloacal (CRC) acima de 70 mm e 35 g de massa corpórea. Após a fixação dos carretéis, os indivíduos foram soltos nos locais de captura e a extremidade livre da linha foi presa ao substrato de modo a desenhar o caminho percorrido pelo animal com o deslocamento. Trena (10 m) e bússola de visada (Suunto KB-14) foram utilizadas para obtenção do comprimento e azimute de cada segmento do trajeto. As medidas são tomadas alinhando-se a bússola com a direção da linha ao próximo ponto de mudança de direção ($> 5^\circ$). Desta forma, foram obtidos a distância percorrida em linha reta e respectiva direção, e o comprimento total da linha (distância real percorrida) para estimativas da área de uso. Em função da brevidade no tempo de monitoramento dos indivíduos, optamos por utilizar o termo “área de uso” ao invés de “área de vida” (cf. Cullen Jr. et al., 2004; Tozetti, 2006).



Figura 3. Acoplagem do carretel de linha (*thread bobbin*) em *Bokermannohyla alvarengai* na Serra do Cipó, nas diferentes etapas do procedimento. **A.** indivíduo no momento da captura; **B.** soltura do indivíduo após acoplagem do carretel de linha; **C.** recaptura do indivíduo dois dias após a soltura.

Análise de dados

Para investigar os padrões de atividade de *B. alvarengai*, as distribuições de ocorrência dos indivíduos capturados pelo método das transecções em cada período do dia foram comparadas determinando o período de atividade diária na espécie. Para a atividade sazonal, a influência da sazonalidade na abundância de indivíduos em cada tipo de ambiente (T1, T2 e

T3) foi analisada por meio de modelos lineares generalizados (GLM) aplicando-se um modelo com estruturação dos erros de acordo com uma distribuição de Poisson. Contudo, devido à sobredispersão dos valores apresentados (medidas de desvio maiores do que graus de liberdade), reajustamos o modelo utilizando regressão de quasiPoisson (cf. Crawley, 2005). As taxas de captura foram comparadas entre as estações do ano considerando-se o tipo de ambiente como fator aleatório (*random factor*). Os modelos foram gerados utilizando-se a função *glm* com o pacote “MCMCglmm” (Hadfield, 2010) no programa R 3.1.0 (R Core Team, 2014).

Para identificar a influência de variáveis climáticas nos padrões sazonais de *B. alvarengai*, modelos lineares generalizados mistos (GLMM) foram utilizados com a variável resposta (taxa de captura de indivíduos) seguindo a distribuição de Poisson. Levando em conta a possibilidade de haver dependência entre as observações nos modelos, foram considerados como fatores aleatórios o período do dia, tipo de ambiente e estação do ano. Os modelos contendo os seguintes fatores foram ajustados aos dados: [1] pluviosidade (pluviosidade); [2] vento (vento); [3] umidade relativa do ar (umidade); [4] temperatura do ar (temperatura); [5] efeito aditivo da pluviosidade e umidade relativa do ar (pluviosidade + umidade); [6] pluviosidade e vento (pluviosidade + vento); [7] pluviosidade e temperatura do ar (pluviosidade + temperatura); [8] vento e umidade relativa do ar (vento + umidade); [9] vento e temperatura do ar (vento + temperatura); [10] umidade relativa do ar e temperatura do ar (umidade + temperatura); [11] vento, umidade relativa do ar e temperatura do ar (vento + umidade + temperatura); e [12] efeito aditivo da pluviosidade, do vento, da umidade relativa do ar e da temperatura do ar (pluviosidade + vento + umidade + temperatura). O procedimento de seleção de modelos com o critério de informação de Akaike ajustado para pequenas amostras (AIC_c) foi empregado, onde considera-se o modelo mais parcimonioso aquele com menor valor de AIC_c . (Anderson e Burnham, 2002). O peso de AIC_c (ωAIC_c) também foi calculado como medida adicional à força de evidência de cada modelo, sendo que maiores valores de ωAIC_c indicam maior probabilidade de parcimônia entre o conjunto de modelos candidatos (Mazerolle, 2006). Apenas os modelos com $\Delta < 2$ em relação ao melhor modelo foram considerados de alto suporte nas análises (cf. Anderson e Burnham, 2002). Utilizamos a função *glmer* com o pacote “lme4” (Bates, et al., 2013) no programa R 3.1.0 (R Core Team, 2014).

O uso do microambiente foi caracterizado com observações diretas, onde as frequências de ocorrência da espécie em cada substrato foram quantificadas e expressas em tabela de frequência. Para averiguar o macroambiente mais ocupado pela espécie e, conseqüentemente o preferido, os diferentes tipos de ambientes amostrados foram analisados por modelos lineares

generalizados, da mesma forma que para avaliar a atividade sazonal. As taxas de captura foram comparadas entre os ambientes considerando-se as estações do ano como fator aleatório.

Taxas de deslocamento médio diário (DD) para cada indivíduo foram calculadas dividindo-se o deslocamento total (DT; soma de todos os segmentos do trajeto), pelo tempo em que o indivíduo foi monitorado em horas. Para descrever os padrões de deslocamento, foram considerados somente períodos de 24 horas ininterruptas de rastreamento, sem interferências externas. Quatro animais foram acompanhados por 24 horas consecutivas (um em cada estação do ano) durante o rastreamento por carretel na tentativa de caracterizar as diferentes atividades ao longo do dia. Assim, para evitar interferência da presença do observador, estes períodos de acompanhamento foram retirados das análises. Dois animais foram submetidos ao implante de *datalogger* de temperatura por meio de cirurgia com o intuito de correlacionar a variação da temperatura corpórea com o tipo de comportamento ao longo do dia. Estes indivíduos também foram acompanhados por 24 horas em campo após recuperação cirúrgica. Da mesma forma, além da exclusão destes períodos de acompanhamento das análises de padrões de deslocamento, os resultados provenientes do rastreamento destes indivíduos foram avaliados com cautela. Nos casos em que o animal utilizou toda a linha disponível do carretel, o último período de deslocamento a partir do último contato visual foi excluído das análises.

Para as estimativas de área de uso dos indivíduos avaliados, os valores em coordenadas polares foram transformados em coordenadas cartesianas através da fórmula: $x = r \cos \theta$, $y = r \sin \theta$, onde r representa a distância entre dois pontos e θ o ângulo. Os valores foram então convertidos em coordenadas UTM e a área de uso foi calculada pelo método do Mínimo Polígono Convexo (MPC, 100%) (cf. Mohr, 1947; Hayne, 1949). Para as áreas de uso estimadas pelo MPC foi também calculada a proporção de sobreposição das áreas entre os indivíduos rastreados, par a par. O MPC e a sobreposição foram estimados com o programa R 3.1.0 (R Core Team, 2014) e pacote “adehabitatHR” (Calenge, 2006).

A intensidade do uso do ambiente (IU) foi calculada para cada indivíduo dividindo-se a distância total percorrida (DT) pelo MPC (cf. Loretto e Vieira, 2005). Para manter as variáveis na mesma escala foi utilizada a raiz quadrada dos valores de área dos polígonos. Como o tempo de amostragem variou entre os animais e para tornar a IU comparável entre eles, o valor obtido foi dividido pelo tempo de monitoramento retornando um valor de IU diário (IUD), onde maiores valores correspondem à alta intensidade de uso a qual, por sua vez, reflete tendências de fidelidade ao sítio.

O deslocamento diário e IUD foram comparados entre fêmeas e machos por Mann-Whitney-Wilcoxon. Devido ao baixo número de indivíduos com resultados satisfatórios

durante o outono, os monitoramentos foram agrupados em estação chuvosa (primavera e verão) e estação seca (outono e inverno) para comparações entre as estações através do teste Mann-Whitney-Wilcoxon. As análises foram realizadas com o programa estatístico R 3.1.0 (R Core Team, 2014). Para todas as análises, diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Foram realizados 48 períodos de busca ativa nas transecções amostradas (Tabelas 1 e 2). Em um total de 302,3 horas de busca foram capturados 93 indivíduos por esse método, sendo que 63 estavam ativos e 30 animais encontravam-se em repouso.

Tabela 1. Tempo de amostragem, número de indivíduos e média da taxa de captura entre os períodos do dia, estações do ano e tipo de ambiente amostrado em *Bokermannohyla alvarengai* na Serra do Cipó, por meio do método das transecções.

Período do dia	tempo de amostragem (horas)	n. indivíduos capturados	taxa de captura (animais/hora)
madrugada	81,6	34	0,42
manhã	75	13	0,17
tarde	65,7	16	0,24
noite	80	30	0,38

Estações do ano	tempo de amostragem (horas)	n. indivíduos capturados	taxa de captura (animais/hora)
verão	53,4	29	0,32
outono	90,5	22	0,26
inverno	84,1	32	0,43
primavera	74,3	10	0,19

Tipo de ambiente	tempo de amostragem (horas)	n. indivíduos capturados	taxa de captura (animais/hora)
campo aberto	62	5	0,08
riacho	143,7	32	0,22
campo rochoso	96,6	56	0,58

Tabela 2. Taxas de captura de indivíduos por hora de amostragem em cada tipo de ambiente, período do dia e estações do ano em *Bokermannohyla alvarengai* na Serra do Cipó, por meio do método das transecções.

	verão	outono	inverno	primavera
campo aberto	madrugada	0	0,21	0
	manhã	0	0	0
	tarde	0,22	0	0
	noite	0,16	0	0,33
riacho	madrugada	0,90	0,16	0,34
	manhã	0,38	0,09	0,12
	tarde	0	0	0,57
	noite	0,18	0,08	0,50
campo rochoso	madrugada	0,64	0,80	1,03
	manhã	0,13	0,52	0,14
	tarde	0,14	0,70	0,91
	noite	0,48	1,14	0,60
				1,33

A atividade diária de *B. alvarengai* é exclusivamente noturna, já que espécimes ativos no período diurno (manhã/tarde) não foram registrados neste estudo. Apenas um único indivíduo foi observado em repouso durante a noite. O pico de atividade diária ocorreu no período da madrugada sendo levemente superior ao período noite (Figura 4). As buscas durante os períodos manhã e tarde resultaram no encontro de 13 animais assoalhando com temperatura corpórea (T_c) média de 24,5°C e 16 animais abrigados com T_c média de 21,7°C.

Sazonalmente, a maior abundância de *B. alvarengai* foi observada no inverno, seguido do verão, outono e primavera (Tabela 1; Figura 4). Entretanto, apesar da variação na taxa de captura ao longo do ano, não foram observadas diferenças significativas entre as estações analisando-se separadamente cada ambiente (Tabela 3; Figura 5). Apenas no ambiente T2, composto pelo riacho, a comparação na abundância de indivíduos entre inverno e primavera apresentou valor próximo ao nível de significância.

As análises dos modelos utilizados para detectar um possível efeito das variáveis climáticas sobre a atividade de *B. alvarengai* indicaram que apenas a pluviosidade influenciou de forma negativa a abundância de indivíduos (Tabela 4). Sendo assim, a abundância foi melhor explicada pelo modelo contendo apenas o fator pluviosidade (modelo 1), o qual apresentou maior peso dentre os candidatos ($\omega AIC_c = 0,34$) (ver Apêndice 1 para a descrição de todos os modelos). O modelo mostrou correlação negativa marginalmente significativa ($z = -1,884$, $p = 0,059$, $n = 48$).

Os três tipos de ambientes amostrados possuem características ecofísicas distintas e por conseguinte, apresentaram variação na abundância de indivíduos (Figura 6). O campo rochoso apresentou maior número de capturas em relação ao riacho e campo aberto, revelando-se como o ambiente mais ocupado pela espécie (Tabela 1; Figura 4). Quando analisados por estação do ano, apenas foi observada diferença significativa na taxa de captura de indivíduos entre os ambientes T1 e T3 ($t = 3,533$, $p = 0,006$) e entre T2 e T3 ($t = 3,533$, $p = 0,05$) (Tabela 5; Figura 7) no outono, e entre T1 e T3 no inverno ($t = 2,522$, $p = 0,033$) (Tabela 5; Figura 7).

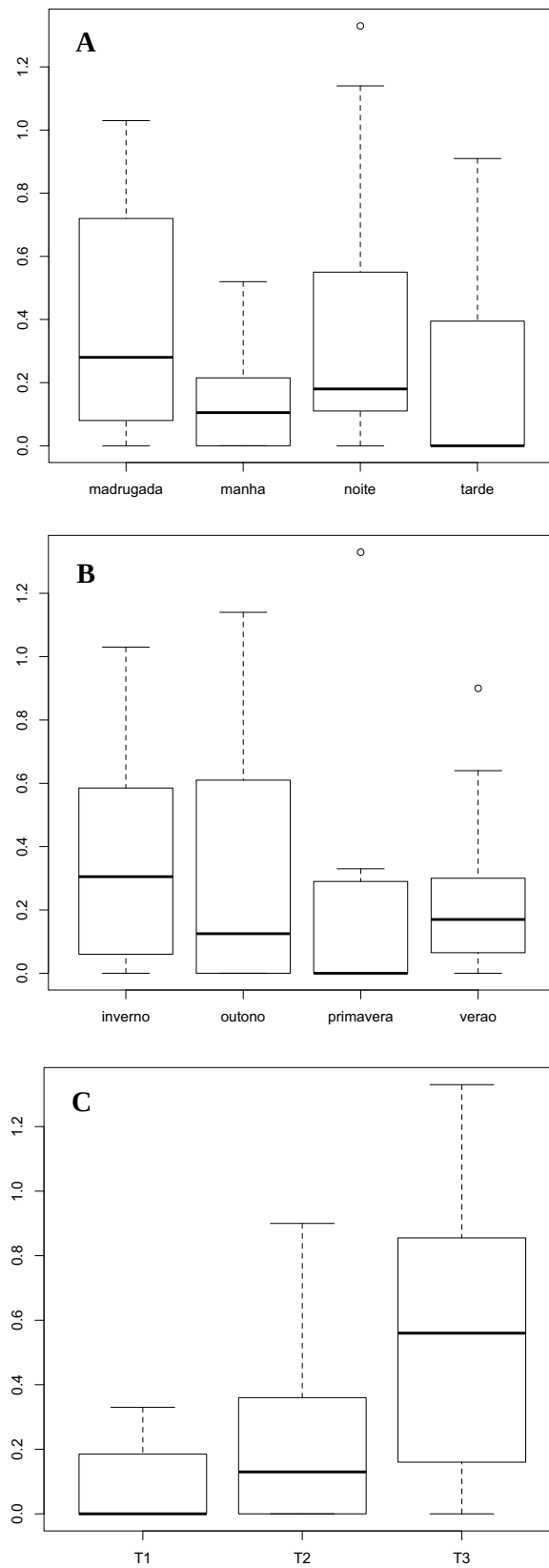


Figura 4. Variação da abundância de indivíduos de *Bokermannohyla alvarengai* na Serra do Cipó medida em taxa de captura (animais/hora), ao longo dos períodos do dia (**A**), estações do ano (**B**), e tipos de ambientes amostrados (**C**). T1: campo aberto; T2: riacho; T3: campo rochoso. Linha central = mediana; limites das caixas = 1° e 3° quartis (25 a 75% da variação dos dados); linhas verticais = valores mínimos e máximos.

Tabela 3. Comparação da taxa de captura de indivíduos de *Bokermannohyla alvarengai* na Serra do Cipó entre as estações do ano considerando os tipos de ambiente como fatores aleatórios (*random factors*). Os resultados foram obtidos através de modelos utilizando-se regressão de quasiPoisson.

Tipo de ambiente	estações do ano	estimativa	erro padrão	<i>t</i>	<i>p</i>
campo aberto	inverno*outono	-2,696	1,413	-0,178	0,862
	inverno*primavera	0,201	1,260	0,159	0,876
	inverno*verão	0,342	1,222	0,280	0,785
riacho	inverno*outono	-1,534	0,809	-1,896	0,082
	inverno*primavera	-2,391	1,177	-2,032	0,065
	inverno*verão	-0,047	0,488	-0,096	0,925
campo rochoso	inverno*outono	0,165	0,466	0,354	0,730
	inverno*primavera	-0,339	0,531	-0,638	0,536
	inverno*verão	-0,900	0,637	-1,412	0,183

O microambiente mais utilizado pelos indivíduos foi o substrato composto por rocha, utilizado por 81,7% do total de animais capturados nas amostragens (Tabela 6; Figura 8). Neste tipo de microambiente, os indivíduos foram observados tanto em condição exposta ($n = 46$) como abrigados em fendas de rochas ($n = 30$). Os demais tipos de substrato ocupados pelos animais, corresponderam a menos de 20% dos registros. Apenas um indivíduo foi observado em repouso em um dos substratos que não corresponderam ao rochoso.

Para avaliar a área de uso em *B. alvarengai*, 23 indivíduos foram rastreados por meio da técnica do carretel de linha, sendo 6 fêmeas e 17 machos (Tabela 7; Apêndice 2). Entretanto, dois machos foram excluídos das análises; o dispositivo se rompeu nos primeiros movimentos em um dos animais, e o segundo indivíduo não se deslocou do local de captura durante o monitoramento (um dos animais com implante de *datalogger*). O tempo de permanência do carretel nos animais variou de 27 a 160 horas, com tempo médio de 66 horas/indivíduo.

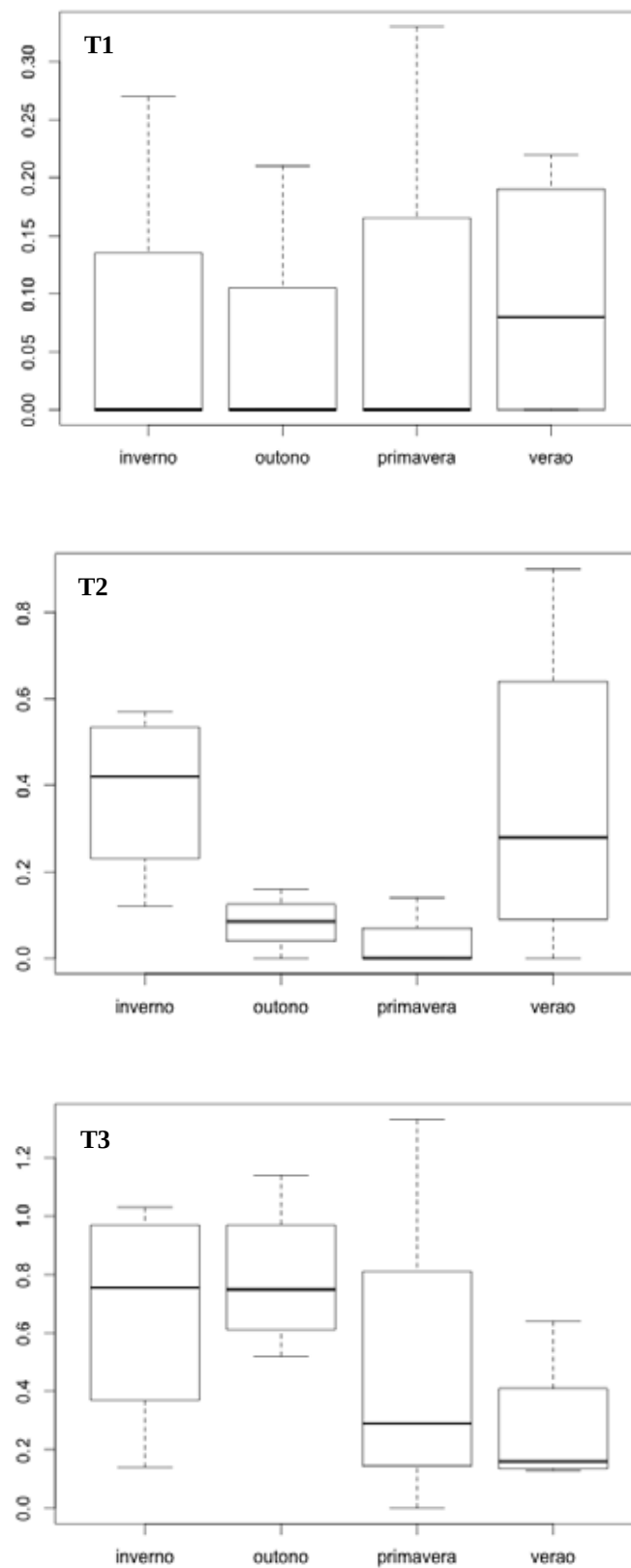


Figura 5. Variação da abundância de indivíduos de *Bokermannohyla alvarengai* na Serra do Cipó medida em taxa de captura (animais/hora) entre as estações do ano em cada tipo de ambiente amostrado. T1: campo aberto; T2: riacho; T3: campo rochoso. Linha central = mediana; limites das caixas = 1° e 3° quartis (25 a 75% da variação dos dados); linhas verticais = valores mínimos e máximos.

Tabela 4. Seleção dos melhores modelos baseada no critério de informação de Akaike ajustado para pequenas amostras (AIC_c) para avaliar a influência de variáveis climáticas nos padrões de abundância sazonal de *Bokermannohyla alvarengai* na Serra do Cipó. ΔAIC_c : diferença entre AIC_c do respectivo modelo e do modelo mais parcimonioso); ωAIC_c : peso de AIC_c (maiores valores indicam maior probabilidade de parcimônia). * indica modelo mais parcimonioso.

Modelos	k	AIC_c	ΔAIC_c	ωAIC_c
pluviosidade*	4	221,10	0,00	0,34
pluviosidade + vento	3	223,95	1,42	0,17
pluviosidade + umidade	3	224,35	1,82	0,14

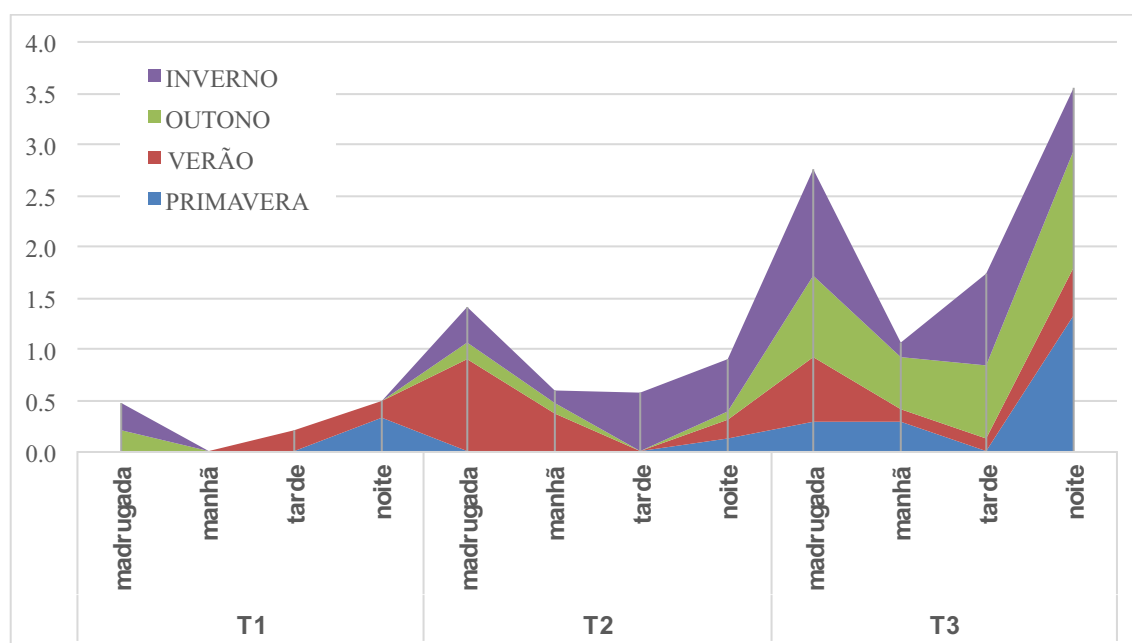


Figura 6. Somatória da taxa de captura de indivíduos (animais/hora) de *Bokermannohyla alvarengai* na Serra do Cipó durante as amostragens pelo método das transecções, considerando o tipo ambiente, período do dia e estação do ano. T1: campo aberto; T2: riacho; T3: campo rochoso.

Considerando todos os animais, as taxas de deslocamento diário variaram de 7,9 a 57,3 m no total com deslocamento médio de 25,3 m/dia (Tabelas 7 e 8). O deslocamento diário máximo foi de 88,5 m. Um indivíduo permaneceu no mesmo ponto de um dia para o outro, e um segundo indivíduo permaneceu dois dias consecutivos no local de captura. Analisando-se fêmeas e machos separadamente, as fêmeas apresentaram taxas de deslocamento inferiores com média de 19,5 m/dia ($n = 7$), enquanto que os machos se deslocaram 27 m/dia ($n = 15$) (Tabela

8). Entretanto, não houve diferença significativa nos deslocamentos médios diários entre os sexos (Mann-Whitney-Wilcoxon, $W = 32$, $p = 0,433$). A estação chuvosa apresentou média de deslocamento diário de 26,4 m/dia sendo superior à estação seca, 22,5 m/dia (Tabela 8), mas os valores não foram significativamente diferentes (Mann-Whitney-Wilcoxon, $W = 47$, $p = 0,971$). Desconsiderando os animais que permaneceram imóveis nos locais de captura, na estação chuvosa foi registrado tanto o menor como o maior deslocamento diário.

Tabela 5. Comparação da taxa de captura de indivíduos de *Bokermannohyla alvarengai* na Serra do Cipó entre os tipos de ambientes amostrados considerando as estações do ano como fatores aleatórios (*random factors*). Os resultados foram obtidos através de modelos utilizando-se regressão de quasiPoisson. T1: campo aberto; T2: riacho; T3: campo rochoso. * indica diferença significativa.

Estação do ano	tipo de ambiente	estimativa	erro padrão	t	p
verão	T1*T2	1,346	0,922	1,459	0,179
	T1*T3	1,054	0,954	1,104	0,298
	T2*T3	-0,292	0,641	-0,456	0,659
outono	T1*T2	0,452	0,951	0,475	0,646
	T1*T3	2,711	0,767	3,533	0.006*
	T2*T3	2,259	0,623	3,626	0.005*
inverno	T1*T2	1,735	0,941	1,843	0,098
	T1*T3	2,295	0,910	2,522	0.033*
	T2*T3	0,561	0,457	1,227	0,251
primavera	T1*T2	-0,858	2,005	-0,428	0,679
	T1*T3	1,756	1,185	1,482	0,173
	T2*T3	2,613	1,741	1,501	0,168

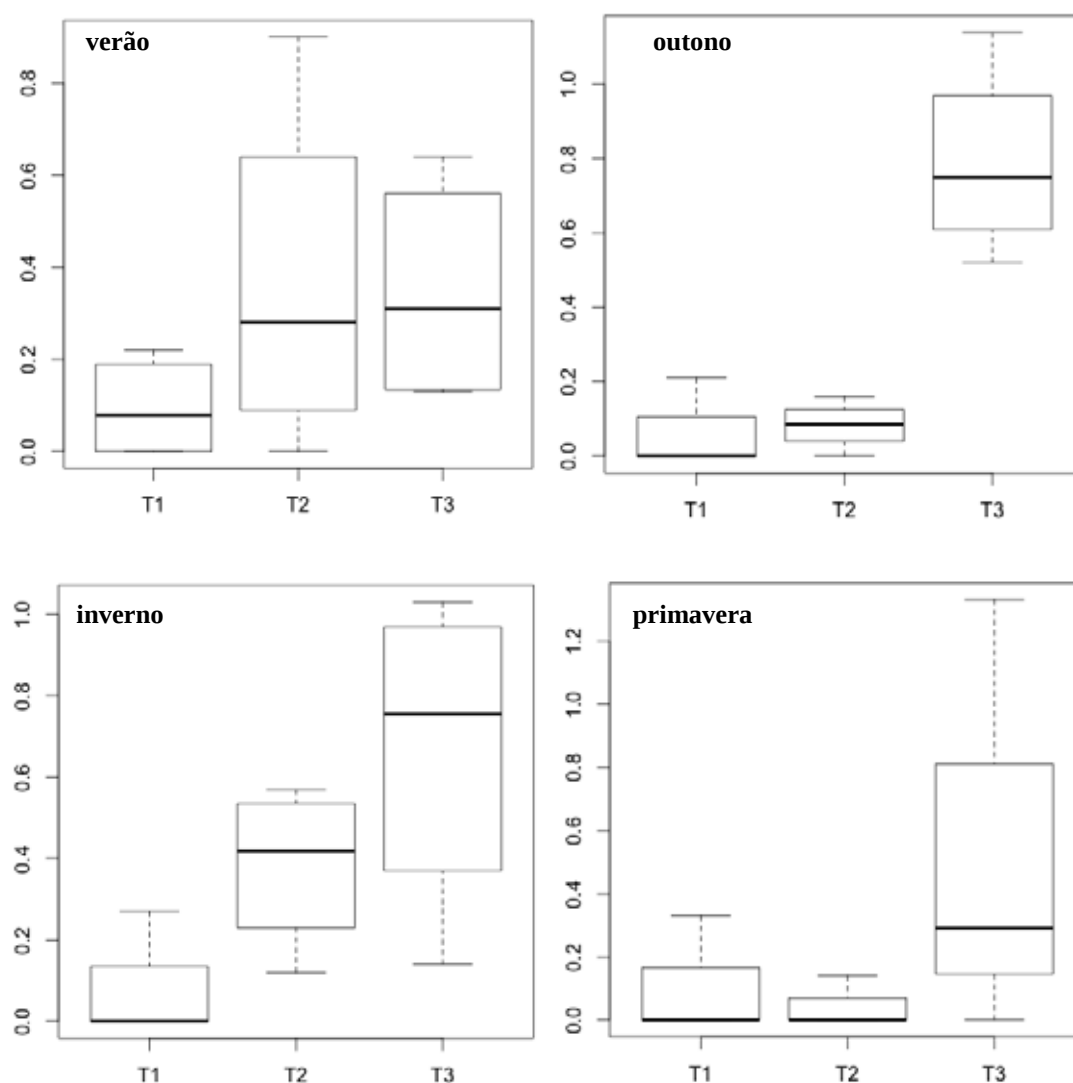


Figura 7. Variação da abundância de indivíduos de *Bokermannohyla alvarengai* na Serra do Cipó medida em taxa de captura (animais/hora) entre os tipos de ambientes amostrados em cada estação do ano. T1: campo aberto; T2: riacho; T3: campo rochoso. Linha central = mediana; limites das caixas = 1° e 3° quartis (25 a 75% da variação dos dados); linhas verticais = valores mínimos e máximos.

Tabela 6. Caracterização do microambiente utilizado por indivíduos de *Bokermannohyla alvarengai* na Serra do Cipó. Número de indivíduos (N), frequência de ocorrência (%), e registro de atividade (em atividade, em repouso) obtidos por meio do método das transecções.

tipo de substrato	n	%	em atividade	em repouso
água	2	2,2	2	0
solo	3	3,2	2	1
vegetação	12	12,9	12	0
rocha	46	49,5	32	10
fenda rocha	30	32,3	11	19
total	93	100	59	30

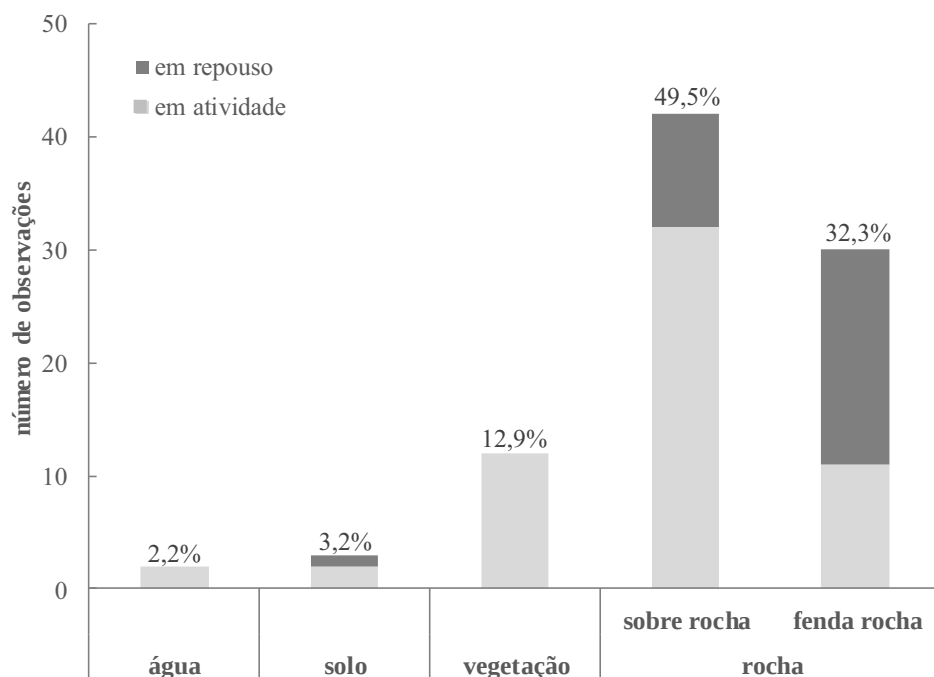


Figura 8. Número de indivíduos de *Bokermannohyla alvarengai* observados nos diferentes tipos de substratos amostrados pelo método das transecções na Serra do Cipó ($n = 93$). A frequência relativa de uso é indicada acima da barra.

A área de uso calculada variou de 9,2 a 856,6 m² (Tabela 7) com área média de 232,9 m² considerando todos os indivíduos, 285,5 m² somente fêmeas e 211,9 m² considerando somente machos (Tabela 8). Entre as estações, a área média de uso na seca foi de 192,5 m² e na chuvosa 277,4 m² (Tabela 7). Dos 21 animais considerados nas análises apenas cinco apresentaram sobreposição de área de uso. Houve sobreposição de área entre BA7 e BA213 de 83,6 m², entre BA213 e BA58 de 50,6 m², e entre BA164 e BA165 de 96,8 m² (MPC, 100%; Figura 9). Entretanto, dentre estes animais com áreas sobrepostas, apenas BA164 e BA165 (sobreposição de cerca de 40% e 70% da área de uso total, respectivamente) foram rastreados simultaneamente sugerindo, portanto, baixo compartilhamento de áreas na população estudada.

A intensidade de uso diário do ambiente (IUD) variou de 0,94 a 5,26 com média de 2,01 (Tabela 8). Não houve diferença significativa entre os sexos (Mann-Whitney-Wilcoxon, $W = 41,5$, $p = 0,815$) (Figura 10a), e entre estações (Mann-Whitney-Wilcoxon, $W = 29,5$, $p = 0,078$) (Figura 10b).

Tabela 7. Padrões de deslocamento e da área de uso em indivíduos de *Bokermannohyla alvarengai* na Serra do Cipó, rastreados pela técnica do carretel de linha. CRC: comprimento rostro-cloacal; massa: massa corpórea; TM: tempo de amostragem; DD: deslocamento médio diário; DT: deslocamento total; área: área total utilizada; e IUD: intensidade de uso diário do ambiente. Dispositivo: condição ao final do monitoramento sendo dividida em R (retirado), F (fim da linha disponível), e M (animal encontrado morto). * animais que foram acompanhados por 24hs consecutivas durante o rastreamento. ** animal submetido ao implante de *data logger* de temperatura.

animal	sexo	CRC (mm)	massa (g)	estação	TM (horas)	DD (m/dia)	DT (m)	área (m²)	IUD	dispositivo
BA7	macho	76,85	43,9	outono	29	43,9	53,1	148,8	3,60	R*
BA24	macho	81,67	60,9	outono	72	7,9	23,8	56,8	1,05	M
BA25	fêmea	83,13	56,9	outono	74	15,2	46,9	70,0	1,82	R
BA37	fêmea	88,51	68,2	inverno	72	24,4	73,2	256,8	1,52	F
BA41	macho	91,32	80,5	inverno	76	24,8	78,6	314,7	1,40	R**
BA46	macho	96,26	81,4	inverno	88	16,4	60,0	246,9	1,04	R
BA58	fêmea	92,89	78,4	primavera	95	31,5	124,9	856,6	1,08	R*
BA60	macho	88,53	73,4	primavera	44	39,6	72,7	427,4	1,92	F
BA64	macho	94,23	81,4	primavera	52	8,7	18,9	9,2	2,88	R
BA65	macho	93,7	80	primavera	45	45,0	84,4	117,5	4,15	R
BA69	macho	126,63	99,4	primavera	40	57,3	95,5	631,0	2,28	R
BA81	macho	99,95	85,5	verão	160	12,8	85,4	184,7	0,94	R*
BA162	fêmea	81,4	42,7	inverno	64	20,4	54,4	171,5	1,56	F
BA164	macho	95,06	93,2	inverno	92	27,1	103,7	263,9	1,67	F
BA165	macho	78,59	41,2	inverno	92	16,1	61,5	138,7	1,36	F
BA172	macho	83,53	51,2	inverno	65	22,4	60,6	164,0	1,75	F
BA180	macho	92,94	80	inverno	88	26,3	96,4	285,2	1,56	R*
BA213	fêmea	76,87	38,5	primavera	48	27,7	55,5	243,5	1,78	F
BA215	macho	69,44	35,5	verão	27	48,9	55,0	86,5	5,26	F
BA216	macho	96,76	88	verão	70	16,9	49,3	102,7	1,67	R
BA217	fêmea	81,12	48	primavera	66	20,8	57,1	114,5	1,94	F

Tabela 8. Deslocamento médio diário (DD), média da área de uso, e média da intensidade de uso diário do ambiente (IUD) em indivíduos de *B. alvarengai* na Serra do Cipó, obtidos por meio da técnica do carretel de linha.

	DD (m/dia)	área de uso (m ²)	IUD
todos os indivíduos	25,3	232,9	2,01
fêmeas	19,5	285,5	1,62
machos	27	211,9	2,17
estação seca	22,5	192,5	1,67
estação chuvosa	26,4	277,4	2,39

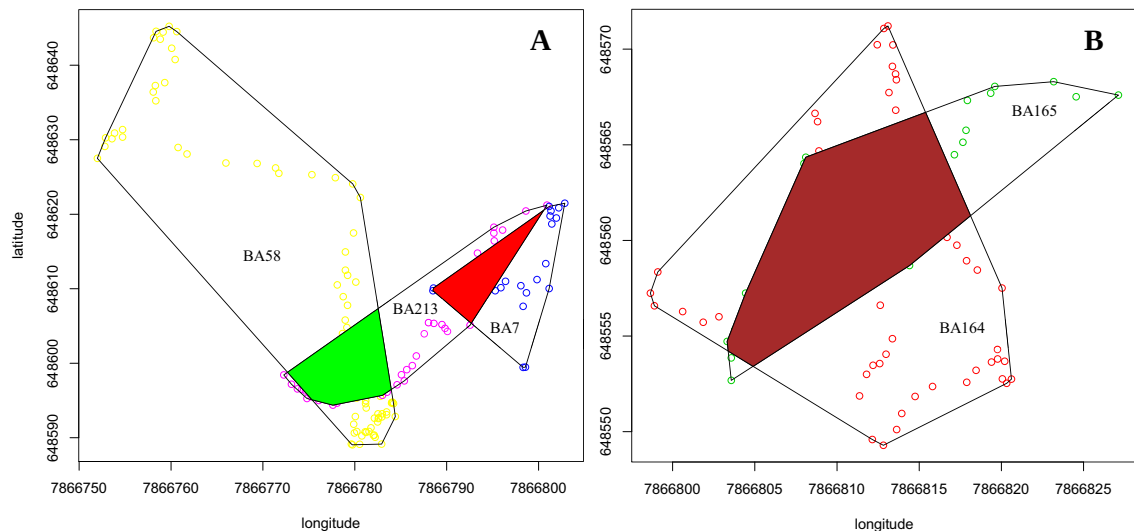


Figura 9. Área de uso e sobreposição das áreas de uso pelo Mínimo Polígono Convexo (MPC, 100%), de cinco animais rastreados pela técnica do carretel de linha. **A.** Sobreposição em vermelho entre BA7 e BA213, e em verde entre BA213 e BA58. **B.** Sobreposição entre BA164 e BA165.

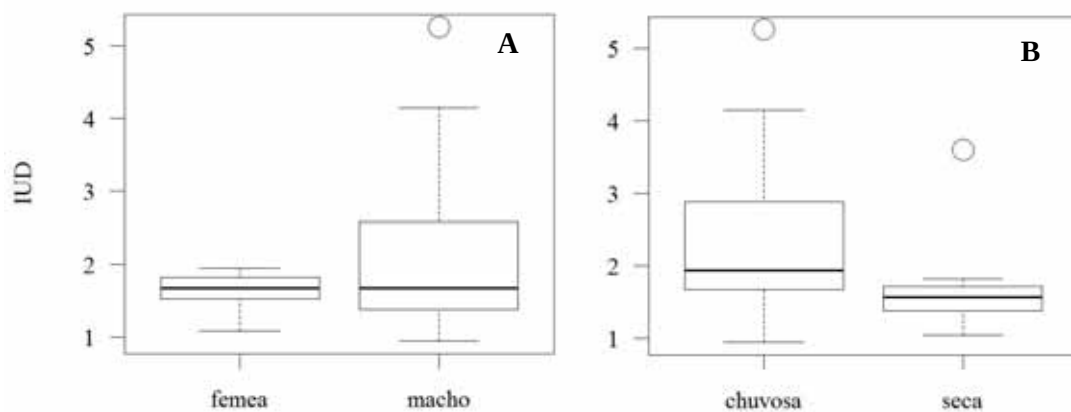


Figura 10. Intensidade de uso diário (IUD) entre fêmeas e machos **(A)** e entre estação seca e chuvosa **(B)**, dos animais rastreados pela técnica do carretel de linha.

DISCUSSÃO

Padrões de atividade e seleção do ambiente

O tegumento altamente permeável dos anfíbios pode ser apontado como um dos principais componentes que moldaram a história de vida do grupo, como por exemplo, a evolução de hábitos noturnos (Crawford, 1934; Pough, 2007; Crump, 2009). De fato, a grande maioria dos anfíbios terrestres apresenta atividade exclusivamente noturna evitando, assim, as elevadas temperaturas e baixa umidade relativa do ar durante o dia (Duellman e Trueb, 1994). *Bokermannohyla alvarengai* segue este padrão de atividade diária já que indivíduos ativos no período diurno não foram registrados, corroborando os dados disponíveis na literatura sobre o hábito da espécie. O acompanhamento de alguns indivíduos por 24 horas consecutivas na área de estudo indicou que os animais procuram sítios para o repouso entre 05:00 e 06:00 horas da manhã com o nascer do sol, retomando suas atividades por volta das 18:00 horas. Este padrão de atividade diária é especialmente importante em se tratando de campos rupestres, um ambiente de altitude que pode apresentar condições climáticas severas para a fisiologia dos anfíbios. Caracterizado por grande amplitude térmica diária (elevada temperatura durante o dia e acentuada queda da temperatura a noite), baixa umidade relativa do ar e forte sazonalidade de chuvas, além de condições restritivas do solo (i.e. baixa disponibilidade de água), os campos rupestres poderiam, de certa forma, limitar a manutenção das atividades normais dos anfíbios. Contudo, o grupo exibe uma impressionante capacidade de ajustar sua fisiologia de forma a superar os efeitos diretos das variações de temperatura (Cossins e Bowler, 1987), e este é o caso de *B. alvarengai*. Apesar do hábito noturno, indivíduos são comumente encontrados durante o

dia repousando em rochas completamente expostos à radiação solar, indicando que a espécie encontrou o equilíbrio entre as necessidades fisiológicas e os problemas inerentes ao tipo de ambiente onde vive.

Adicionalmente ao complexo climático diário, os campos rupestres apresentam duas estações bem demarcadas caracterizadas por seca e chuvosa. De acordo com Heyer et al. (1994) temperatura, precipitação e níveis de corpos d'água constituem variáveis ambientais cuja influência tem um papel decisivo no comportamento de anuros. De modo geral, além da forte sensibilidade às condições climáticas, as características reprodutivas dos anfíbios tornam a água uma restrição fundamental (Feder e Burggren, 1992) e, portanto, a sazonalidade pode determinar a abundância de indivíduos. Vários estudos já demonstraram a importância dos fatores climáticos como temperatura e pluviosidade na atividade de reprodução dos anfíbios (Bertoluci, 1998; Bernarde e Anjos, 1999; Bernarde e Kokobum, 1999; Toledo et al, 2003; Brasileiro et al., 2005; Giasson, 2008). De fato, em regiões com clima tropical onde não há sazonalidade climática marcada a reprodução pode ocorrer o ano todo, enquanto que em regiões sazonais a atividade reprodutiva da maioria das espécies se restringe ao período de chuvas (Crump, 1974). Assim, considerando a forte sazonalidade dos campos rupestres, seria esperado maior encontro de indivíduos de *B. alvarengai* durante a primavera, época a qual corresponde ao início da estação chuvosa e período de pico reprodutivo na espécie (ver detalhes sobre o período reprodutivo no capítulo 1). Contudo, a atividade sazonal de *B. alvarengai* não corrobora o padrão geral de atividade de anuros já que não houve diferença significativa na abundância de indivíduos ao longo do ano. De igual modo, a falta de correlação entre variáveis climáticas como temperatura e umidade e a abundância de indivíduos sustenta a ideia de independência da atividade dos animais à estação chuvosa. Adicionalmente, foi detectada uma relação inversamente proporcional entre a atividade de *B. alvarengai* e a pluviosidade, ou seja, quanto menor o índice pluviométrico, maior a abundância de indivíduos. Entretanto, este resultado deve ser avaliado com cautela já que a análise pode ter sido enviesada pelo enorme número de dias de amostragem sem chuva, isto é, grande quantidade de zeros na análise dos modelos.

Apesar de não detectada diferença significativa na abundância de indivíduos entre as estações do ano, uma variação na taxa de captura de indivíduos foi observada. Considerando todos os ambientes amostrados, primavera correspondeu ao período de menor taxa de captura de indivíduos ressaltando a fraca relação entre período reprodutivo e maior encontro de animais, ao passo que a maior taxa de captura foi observada durante o inverno. Estes resultados vão totalmente contra o que é relatado na literatura sobre a sazonalidade do grupo já que o inverno é o período mais frio do ano exercendo influência negativa na atividade da maioria das espécies

de anfíbios. Isto poderia ser simplesmente um efeito direto das condições climáticas da região. A combinação de temperatura ambiente baixa com ausência de chuva (i.e. céu aberto com alta disponibilidade de radiação solar) durante o inverno pode tornar o comportamento de assoalhar especialmente importante durante esta estação do ano. Como os animais assoalhando encontram-se expostos, aumentando sua detectabilidade, os resultados de abundância ao longo das estações poderiam refletir, em parte, diferenças no uso de microambiente pelos animais. Entretanto, o mesmo número de animais assoalhando durante o inverno foi observado no verão e outono sugerindo que outros fatores devem estar envolvidos nesta questão.

Já a segunda maior taxa de captura registrada no verão pode ser explicada principalmente pelo recrutamento de recém-metamorfoseados que ocorre neste período, visto que a época reprodutiva da espécie está restrita ao início da estação chuvosa. Isto é especialmente evidente ao se analisar separadamente os ambientes amostrados (ver Figura 5) onde se observa um aumento na abundância de indivíduos durante o verão no riacho como reflexo da colonização logo após a metamorfose, com posterior deslocamento até o outono para os campos rochosos até a completa migração dos jovens. Ademais, a presença de apenas adultos no riacho durante o inverno e primavera, assim como o ligeiro acréscimo de indivíduos durante o verão no campo aberto (T1) poderia ainda confirmar esta ideia de migração de recém-metamorfoseados do ambiente aquático para os campos rochosos.

Os ambientes utilizados nas transecções apresentam características distintas em termos de fitofisionomia, solo e condições topográficas. Assim, estas variações ecofísicas nos permitiram apontar qual o ambiente mais ocupado pela espécie e, conseqüentemente, o macroambiente preferido. A preferência de *B. alvarengai* por campos rochosos já havia sido relatado através de observações pontuais por Sazima e Bokermann (1977), mas os resultados obtidos no presente estudo permitiram a quantificação da preferência por este macroambiente. Entre as três transecções amostradas, o campo rochoso foi o que apresentou maior abundância de indivíduos em todas as estações do ano. Todavia, foi observada uma queda na taxa de captura durante a estação chuvosa neste tipo de ambiente, possivelmente reflexo direto da baixa disponibilidade de corpos d'água para reprodução. Ou seja, no período chuvoso os animais parecem se deslocar em busca de locais mais apropriados para se reproduzirem.

Ainda assim, é evidente a preferência dos indivíduos pelos campos rochosos mostrando que, de fato, a espécie é bem adaptada à vida rupícola. Este tipo de ambiente constitui o mais apropriado para o comportamento de assoalhar já que os animais ficam sujeitos à maior incidência direta dos raios solares. A paisagem dos campos rochosos é caracterizada por ilhas de rochas soerguidas no sentido leste-oeste e entremeadas por vegetação rupestre, sendo que a

face leste das rochas, apesar da maior exposição ao vento e ao sol, geralmente apresenta superfície mais lisa. E é justamente nesta face das formações rochosas que a maioria dos animais foi observada assoalhando, ou seja, justamente no lado mais exposto à radiação solar onde se posicionam no melhor ângulo sobre as rochas (ou ainda em pequenas fendas) de modo a otimizar a incidência da luz. Neste cenário, os animais encontram as melhores condições para elevação e controle da temperatura corpórea.

O segundo macroambiente mais ocupado pelos animais foi a transecção composta pelo riacho, ambiente intensamente utilizado por adultos durante o período reprodutivo e, conseqüentemente, pelos jovens recém-metamorfoseados. Ao que tudo indica, após o término do período larval e metamorfose, os juvenis abandonam os riachos e dispersam para os campos rochosos onde passam a ocupar as ilhas de rochas. Apesar de também observados nos campos rochosos distantes de corpos d'água, adultos parecem preferir locais mais próximos aos riachos indicando que com o amadurecimento reprodutivo há alteração no padrão de uso do ambiente utilizando de forma mais expressiva áreas mais próximas a corpos de água para a reprodução.

O campo aberto, por sua vez, parece ser utilizado apenas para o deslocamento dos indivíduos entre riachos e campos rochosos já que apresenta carência de rochas, constituindo, portanto, um ambiente pouco atraente para as preferências ecológicas da espécie. Dados do microambiente também confirmam a escolha de *B. alvarengai* pelo sítio rochoso considerando que o microambiente utilizado por cerca de 80% do total de animais capturados foi o substrato rocha. Os demais tipos de substrato ocupados pelos indivíduos aparentemente são substratos utilizados para transição entre os pontos de permanência dos indivíduos como solo e vegetação, e água em caso de período reprodutivo.

Padrões de deslocamento e área de uso

De modo geral, a forma como indivíduos de *B. alvarengai* se deslocam no ambiente é bem variada (ver Figura 9), mas os dados obtidos nos rastreamentos são consistentes com os resultados da caracterização do microambiente indicando que os animais utilizam intensamente o substrato rocha, com uma pequena variação de acordo com a época do ano. Por exemplo, durante o período reprodutivo os indivíduos utilizam rochas mais próximas de corpos d'água, e muitas vezes cruzando os riachos. Além de fornecer rotas precisas, a técnica do carretel possibilita também a identificação de locais de refúgio durante o dia. A seleção de abrigos é geralmente atribuída à necessidade de proteção contra condições ambientais adversas principalmente temperatura e umidade (Cohen e Alford, 1996; Schwarzkopf e Alford, 1996), sendo que os animais, selecionando abrigos de acordo com as condições climáticas, podem

apresentar diferentes refúgios ao longo do ano (ver Seebacher e Alford, 1999). *Bokermannohyla alvarengai*, quando em condição abrigada durante o dia, não apresentou diferença na preferência de refúgios diurnos entre as estações amostradas indicando que o clima não exerce influência na escolha do substrato para o repouso. Os animais somente foram encontrados abrigados em fendas de rochas. Este resultado já era por nós esperado considerando que a espécie possui um complexo mecanismo de regulação da temperatura corpórea e balanço hídrico (ver capítulo 3).

Indivíduos de *B. alvarengai* são capazes de se deslocar até cerca de 90 m em um único dia assim como permanecer no mesmo local por dias consecutivos, sendo as taxas de deslocamento diário não determinadas pela época do ano. Ou seja, não observamos um padrão no deslocamento dos animais monitorados entre as estações seca e chuvosa indicando que a movimentação da espécie não é limitada pelas condições climáticas e, consequentemente, não oscila com o período reprodutivo. É possível que os deslocamentos sejam determinados unicamente pelo forrageamento onde menor movimentação diária significa maior abundância de presas (cf. Pianka, 1973). Entretanto, este resultado poderia ser um viés do baixo número de animais amostrados e principalmente do curto tempo de rastreamento em alguns indivíduos. O mesmo problema pode ser estendido na comparação entre os sexos considerando que utilizamos maior número de machos nas análises (6 fêmeas e 15 machos).

Embora não detectada diferença significativa nas taxas de deslocamento entre os sexos, foi observada uma tendência de menor deslocamento diário nas fêmeas com áreas de uso maiores, tendência também encontrada em outras espécies de anuros (e.g. Sinsch 1988a, 1988b; Muths, 2003). Ao observamos a IUD (intensidade de uso diário), machos apresentaram valores consideravelmente maiores que fêmeas indicando que, de fato, exploram de maneira mais intensa a área de uso. Estes resultados poderiam refletir, de certa forma, tendências de territorialidade nos machos corroborando ainda os dados obtidos acerca da biologia reprodutiva e características morfométricas de *B. alvarengai* (ver capítulo 1).

A técnica do carretel de linha tem sido satisfatoriamente utilizada na caracterização de área de vida diária (*daily home range*; ver Spencer et al., 1990) em pequenos mamíferos (e.g. Cunha e Vieira, 2002; Mendel e Vieira, 2003; Loretto e Vieira, 2005), mas é apontada como inapropriada para estimativas de área de vida no sentido tradicional já que permite apenas estimar a área utilizada em um curto período de tempo (cf. Delciellos et al., 2006). Desta forma, o uso do método no presente estudo, aliado à deficiência no delineamento amostral (grande variação no tempo de amostragem por indivíduo), nos impossibilitou comparações com outras espécies de anuros. Além do mais, a falta de escala temporal nas amostragens se mostrou como

um dos principais problemas encontrados já que compõe um elemento fundamental na definição de área de vida considerando que medidas de espaço absoluto variam em função do tempo (cf. Spencer et al., 1990). Assim, idealmente, para descrever os padrões de deslocamento e uso do ambiente em *B. alvarengai*, com o advento de rádios-transmissores miniaturizados, o uso integrado da rádio-telemetria e rastreamento por carretel de linha poderia ser vantajoso permitindo descrever com detalhes a movimentação dos indivíduos no espaço e tempo, método já satisfatoriamente aplicado em outros anuros de grande porte (e.g. Seebacher e Alford, 1999; Lemckert e Brassil, 2000; Forester et al., 2006).

Informações detalhadas sobre o modo como anfíbios anuros utilizam o ambiente são escassas apesar de fundamentais na caracterização de diversos aspectos da história natural dos organismos. Entretanto, um crescente interesse por estudos que abordam os aspectos envolvidos na dinâmica espaço-temporal do grupo tem surgido recentemente com a percepção de sua importância, principalmente no que diz respeito à conservação das espécies. Porém, as limitações metodológicas constituem ainda o problema central em estudos desta natureza sobretudo em função do tamanho dos animais, salientando, portanto, a necessidade pela busca de métodos mais apropriados na aquisição destes dados. Apesar das limitações da metodologia empregada no presente estudo, nossos resultados permitiram uma melhor compreensão do modo de vida da espécie *B. alvarengai* e de como os animais lidam com as condições ambientais adversas dos campos rupestres. Além de essencial para o conhecimento de informações biológicas básicas, este estudo pode contribuir no futuro com o desenvolvimento de estratégias de conservação fornecendo diretrizes na determinação de áreas prioritárias a serem consideradas para a conservação da espécie.

REFERÊNCIAS

- Ab'Saber, A.N. (1977). Os domínios morfoclimáticos na América do Sul. Primeira aproximação. *Geomorfologia* 52:1–21.
- Aichinger, M. (1987). Annual activity patterns of anurans in a seasonal neotropical environment. *Oecologia* 71(4):583–592.
- Anderson, D.R. & Burnham, K.P. (2002). Avoiding pitfalls when using information-theoretic methods. *The Journal of Wildlife Management* 66(3):912–918.
- Bates, D., Maechler, M. & Bolker, B. (2013). lme4: Linear Mixed-Effects Models using Eigen and R syntax. R package version 0.9999991.3. Available at: <<http://CRAN.R-project.org/package=lme4>>.

- Beebee, T.J. (2009). Amphibian breeding and climate. *Nature* 374(6519):219–220.
- Bernarde, P.S. & Anjos, L. (1999). Distribuição espacial e temporal da anurofauna no Parque Estadual Mata dos Godoy, Londrina, Paraná Brasil (Amphibia: Anura). *Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia PUCRS, Série Zoologia* 12:127–140.
- Bernarde, P.S. & Kokubum, M.N.C. (1999). Anurofauna do Município de Guararapes, Estado de São Paulo, Brasil (Amphibia: Anura). *Acta Biológica Leopoldensia* 21: 89–97.
- Bertoluci, J.A. (1991). Anfíbios anuros. In: Leonel, C. (Ed.). *Intervalos: Fundação para a conservação e produção florestal do Estado de São Paulo*, p. 158–167. São Paulo: Secretaria de Estado de Meio Ambiente.
- Bertoluci, J.A. (1998). Annual patterns of breeding activity in atlantic rainforest anurans. *Journal of Herpetology* 32(4):607–611.
- Berven, K.A. (1990). Factors affecting population fluctuations in larval and adult stages of the wood frog (*Rana sylvatica*). *Ecology* 71(4):1599–1608.
- Blihovde, W.B. (2006). Terrestrial movements and upland habitat use of Gopher Frogs in central Florida. *Southeastern Naturalist* 5(2):265–276.
- Bokermann, W.C.A. (1964). Dos novas espécies de *Hyla* de Minas Gerais y notas sobre *Hyla alvarengai* Bok. (Amphibia, Salientia-Hylidae). *Neotropica* 10:67–76.
- Brasileiro, C.A., Sawaya, R.J., Kiefer, M.C. & Martins, M. (2005). Amphibians of an open cerrado fragment in southeastern Brazil. *Biota Neotropica* 5(2):1–17.
- Brown, J.L., Morales, V. & Summers, K. (2009). Home range size and location in relation to reproductive resources in poison frogs (Dendrobatidae): a Monte Carlo approach using GIS data. *Animal Behaviour* 77(2):547–554.
- Bulger, J.B., Scott Jr., N.J. & Seymour, R.B. (2003). Terrestrial activity and conservation of adult California red-legged frogs *Rana aurora draytonii* in coastal forests and grasslands. *Biological conservation* 110(1):85–95.
- Calenge, C. (2006). The package adehabitat for the R software: a tool for the analysis of space and habitat use by animals. *Ecological Modelling* 197:516–519.
- Cardoso, A.J., Andrade, G.V. & Haddad, C.F.B. (1989). Distribuição espacial em comunidades de anfíbios (Anura) no sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Biologia* 49(1):241–249.
- Carter, S.L., Haas, C.A. & Mitchell, J.C. (2000) Movements and activity of bog turtles (*Clemmys muhlenbergii*) in southwestern Virginia. *Journal of herpetology* 34:75–80.
- Cohen, M.P. & Alford, R.A. (1996). Factors affecting diurnal shelter use by the cane toad, *Bufo marinus*. *Herpetologica* 52(2):172–181.

- Cossins, A.R. & Bowler, K. (1987). Rate compensations and capacity adaptations. In: Temperature biology of animals, pp. 155–203. Netherlands: Springer.
- Crawford, S.C. (1934). The habits and characteristics of nocturnal animals. The Quarterly Review of Biology 9(2):201–214.
- Crawley, M.J. (2005). Statistics: an introduction using R. Chichester: John Wiley & Sons Ltda.
- Crump, M.L. (1971). Quantitative analysis of the ecological distribution of a tropical herpetofauna. Occasional Papers of the Museums of Natural History, University of Kansas 3:1–62.
- Crump, M.L. (1974). Reproductive strategies in a tropical anuran community. Miscellaneous Publications, Museum of Natural History, University of Kansas 61:1–68.
- Crump, M. L. (2009). Amphibian diversity and life history. In: Dodd, C.K. (Ed.). Amphibian Ecology and Conservation. A Handbook of Techniques, p. 3–20. Oxford: Oxford University Press.
- Cullen Jr, L., Rudran, R. & Valladares-Pádua, C. (2004). Métodos de estudos em biologia da conservação e manejo da vida silvestre. Curitiba: UFPR.
- Cunha, A. & Vieira, M.V. (2002). Support diameter, incline, and vertical movements of four didelphid marsupials in the Atlantic Forest of Brazil. Journal of Zoology 258: 419–426.
- Delciellos, A.C.; Loretto, D. & Vieira, M.V. (2006). Novos métodos no estudo da estratificação vertical de marsupiais neotropicais. Oecologia Brasiliensis 10(2):135–153.
- Dodd, C.K. & Cade, B.S. (1998). Movement patterns and the conservation of amphibians breeding in small, temporary wetlands. Conservation Biology 12(2):331–339.
- Dole, J.W. (1965). Summer movements of adult Leopard Frogs, *Rana pipiens* Schreber, in northern Michigan. Ecology 46:236–255.
- Dole, J.W. (1967). Spring movements of leopard frogs *Rana pipiens* Schreber, in Northern Michigan. American Midland Naturalist 78:167–181.
- Dole, J.W. (1968). Homing in leopard frogs *Rana pipiens*. Ecology 49:386–399.
- Dole, J.W. (1972). The role of olfaction and audition in the orientation of leopard frogs, *Rana pipiens*. Herpetologica 28:258–260.
- Donnelly, M.A., Guyer, C., Juterbock, J.E. & Alford, R.A. (1994). Techniques for marking amphibians. In: Heyer, W.R., Donnelly, M.A., McDiarmid, R.W., Hayek, L.C. & Foster, M.S. (Ed.). Measuring and Monitoring Biological Diversity, Standard Methods for Amphibians, pp. 277–284. Washington, D.C.: Smithsonian Inst. Press.

- Duellman, W.E. (1988). Patterns of species diversity in anuran amphibians in the American Tropics. *Annals Missouri Botanical Garden, Missouri* 75:79–104.
- Duellman, W.E. & Lizana, M. (1994). Biology of a sit-and-wait predator, the leptodactylid frog *Ceratophrys cornuta*. *Herpetologica* 51–64.
- Duellman, W.E. & Trueb, L. (1994). *Biology of amphibians*. New York: McGraw-Hill Book Company.
- Dunning, J.B., Danielson, B.J. & Pulliam, H.R. (1992). Ecological processes that affect populations in complex landscapes. *Oikos* 65:169–175.
- Eiten, G. (1978). Delimitation of Cerrado concept. *Vegetatio* 36:169–178.
- Eterovick, P.A. & Sazima, I. (2000). Structure of an anuran community in a montane meadow in southeastern Brazil: effects of seasonality, habitat, and predation. *Amphibia-Reptilia* 21:439–461.
- Eterovick, P.A. & Sazima, I. (2004). *Anfibios da Serra do Cipó, Minas Gerais – Brasil*. Belo Horizonte: PUC Minas.
- Eterovick, P.C., Yazbeck, G.M., Dergam, J.A. & Kalapothakis, E. (2009). Small scale population structure in the treefrog *Bokermannohyla saxicola* (Bokermann, 1964) (Anura, Hylidae). *South American Journal of Herpetology* 4(3):235–244.
- Eterovick, P.C., Oliveira, F.F. & Tattersall, G.J. (2010). Threatened tadpoles of *Bokermannohyla alvarengai* (Anura: Hylidae) choose backgrounds that enhance crypsis potential. *Biological Journal of Linnean Society* 101(2):437–446.
- Feder, M.E. & Burggren, W.W. (1992). *Environmental physiology of the amphibians*. Chicago: University of Chicago Press.
- Forester, D.C., Snodgrass, J.W., Marsalek, K. & Lanham, Z. (2006) Post-breeding dispersal and summer home range of female American toads (*Bufo americanus*). *Northeastern Naturalist* 13:59–72.
- Gamble, L.R., McGarigal, K. & Compton, B.W. (2007). Fidelity and dispersal in the pond-breeding amphibian, *Ambystoma opacum*: implications for spatio-temporal population dynamics and conservation. *Biological Conservation* 139(3):247–257.
- Giasson, L.O.M. (2008). *Atividade sazonal e uso do ambiente por anfíbios da Mata Atlântica no alto da Serra do Mar*. *Atividade sazonal e uso do ambiente por anfíbios da Mata Atlântica no alto da Serra do Mar*. Tese (Doutorado em Zoologia) Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
- Gibbons, J.W., Scott, D.E., Ryan, T.J., Buhlmann, K.A., Tuberville, T.D., Metts, B.S., ... & Winne, C.T. (2000). The Global Decline of Reptiles, Déjà Vu Amphibians Reptile species are declining on a global scale. Six significant threats to reptile populations are habitat loss and

degradation, introduced invasive species, environmental pollution, disease, unsustainable use, and global climate change. *BioScience* 50(8):653–666.

Gibbs, J.P. (1998). Amphibian movements in response to forest edges, roads, and streambeds in southern New England. *The Journal of Wildlife Management* 62(2):584–589.

Giulietti, A.M. (1996). Flora: diversidade, distribuição geográfica e endemismos. In: Fernandes, G.W. (Ed.). *Serra do Cipó: ecologia e evolução*, pp. 84–100. Rio de Janeiro: Vozes.

Giulietti, A.M., Menezes, N.L., Pirani, J.R., Meguro, M. & Wanderley, M.G.L. (1987). Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Caracterização e lista de espécies. *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo* 9:1–152.

Grubb, J.C. (1970) Orientation in post-reproductive Mexican toads, *Bufo valliceps*. *Copeia* 674–680.

Haddad, C.F.B. & Sazima, I. (1992). Anfíbios anuros da Serra do Japi. In: Morellato, L.P.C. (Ed.). *História Natural da Serra do Japi: Ecologia e preservação de uma área florestal no sudeste do Brasil*, p.188–211. Campinas: Editora da UNICAMP/FAPESP.

Hadfield, J.D. (2010). MCMC methods for Multiresponse Generalised Linear Mixed Models: The MCMCglmm R Package. *Journal of Statistical Software* 33(2):122.

Hayne, D.W. (1949). Calculation of size of home range. *Journal of Mammalogy* 30:1–18.

Heyer, W.R., Rand, A.S., Cruz, C.A.G., Peixoto, O.L. & Nelson, C.E. (1990). Frogs of Boracéia. *Arquivos de Zoologia* 31(4):231–410.

Heyer, W.R. (1994). Thread bobbins. In: Heyer, W.R., Donnelly, M.A., McDiarmid, R.W., Hayek, L.A.C. & Foster, M.S. (Ed.). *Measuring and Monitoring Biological Diversity: Standard Methods for Amphibians*, p. 153–155. Washington, DC: Smithsonian Institution Press.

Heyer, W.R., Donnelly, M.A., McDiarmid, R.W., Hayek, L.A.C. & Foster, M.S. (1994). *Measuring and monitoring biological diversity: standard methods for amphibians*. Washington, DC: Smithsonian Institution Press.

Hutchison, V.H. & Dupré, R.K. (1992). Thermoregulation. In: Feder, M.E. & Burggren, W.W. (Ed.). *Environmental Physiology of the Amphibians*, pp. 206–249. Chicago: The University of Chicago Press.

Jaeger, R.G. (1994). Transect sampling. In: Heyer, W.R., Donnelly, M.A., McDiarmid, R.W., Hayek, L.A.C. & Foster, M.S. (Ed.). *Measuring and Monitoring Biological Diversity: Standard Methods for Amphibians*, p. 103–107. Washington, DC: Smithsonian Institution Press.

Jameson, D.L. (1966). Rate of weight loss of tree frogs at various temperatures and humidities. *Ecology* 47(4):605–613.

- Joly, A.B. (1970). *Conheça a Vegetação Brasileira*. São Paulo: Polígono.
- Key, G.E. & Woods, R.D. (1996). Spool-and-line studies on the behavioural ecology of rats (*Rattus* spp.) in the Galapagos Islands. *Canadian Journal of Zoology* 74(4):733–737.
- Köppen, W. (1900). Versuch einer Klassifikation der Klimate, vorzugsweise nach ihren Beziehungen zur Pflanzenwelt. *Geographische Zeitschrift* 6(11):593–611.
- Lemckert, F.L. & Brassil, T. (2000) Movements and habitat use of the endangered 827 giant barred river frog (*Mixophyes iteratus*) and the implications for its conservation in timber production forests. *Biological Conservation* 96:177–184.
- Lemckert, F.L. (2004) Variations in anuran movements and habitat use: implications for conservation. *Applied Herpetology* 1:165–181.
- Loretto, D. & Vieira, M. V. (2005). The effects of reproductive and climatic seasons on movements in the black-eared opossum (*Didelphhis aurita* Wied-Neuwied, 1826). *Journal of Mammalogy* 86(2): 287–293.
- Mazerolle, M.J. (2006). Improving data analysis in herpetology: using Akaike's Information Criterion (AIC) to assess the strength of biological hypotheses. *Amphibia Reptilia* 27(2):169–180.
- Mendel, S.M. & Vieira, M.V. (2003). Movement distances and density estimation of small mammals using the spool-and-line technique. *Acta Theriologica* 48:298–300.
- Miles, M.A., De Souza, A.A. & Pova, M.M. (1981). Mammal tracking and nest location in Brazilian forest with an improved spool-and-line device. *Journal of Zoology* 195:331–347.
- Moura, M.C., Caparelli, A.C., Freitas, S.R., & Vieira, M.V. (2005). Scale-dependent habitat selection in three didelphid marsupials using the spool-and-line technique in the Atlantic forest of Brazil. *Journal of Tropical Ecology* 21(3):337–342.
- Mohr, C.O. (1947). Table of equivalent populations of North American small mammals. *American Midland Naturalist* 37:223–249.
- Muths, E. (2003): Home range and movements of boreal toads in undisturbed habitat. *Copeia* 2003:160–165.
- Nathan, R. (2008). An emerging movement ecology paradigm. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(49):19050–19051.
- Pearce, T.A. (1990) Spool and line technique for tracing field movements of terrestrial snails. *Walkerana* 4:307–316.
- Pianka, E R. (1973). The structure of lizard communities. *Annual review of ecology and systematics*, 53–74.

Pombal Jr, J.P. (1997). Distribuição espacial e temporal de anuros (Amphibia) em uma poça permanente na Serra de Paranapiacaba, sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Biologia* 57:583–594.

Pough, F.H. (2007). Amphibian biology and husbandry. *ILAR Journal* 48(3):203–213.

Rossa-Feres, D.C. & Jim, J. (1994). Distribuição sazonal em comunidades de anfíbios anuros na região de Botucatu, São Paulo. *Revista Brasileira de Biologia* 54:323–334. 1994.

R Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available at: <<http://www.R-project.org/>>.

Richards, S.J., Sinsch, U. & R. Alford. (1994). Radio tracking. In: Heyer, W.R., Donnelly, M.A., McDiarmid, R.W., Hayek, L.A.C. & Foster, M.S. (Ed.). *Measuring and Monitoring Biological Diversity: Standard Methods for Amphibians*, p. 155–158. Washington, DC: Smithsonian Institution Press.

Ricketts, T.H. (2001). The matrix matters: effective isolation in fragmented landscapes. *The American Naturalist* 158(1):87–99.

São Pedro, V.A., Drummond, L.O., Costa, H.C., Fernandes, V.D. & Feio, R.N. (2008). Predação de embriões por girinos de *Bokermannohyla alvarengai* (Anura, Hylidae) em riacho temporário na Serra do Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil. *Boletim do Museu de Biologia Melo Leitão*, 24:111–118.

Sazima, I. & Bokermann, W.C.A. (1977). Anfíbios da Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil. 3, Observações sobre a biologia de *Hyla alvarengai* Bok. (Anura, Hylidae). *Revista Brasileira de Biologia* 37:413–417.

Schlacher, T.A., & Lucrezi, S. (2010). Compression of home ranges in ghost crabs on sandy beaches impacted by vehicle traffic. *Marine biology* 157(11):2467–2474.

Schoener, T.W. (1974). Resource partitioning in ecological communities. *Science* 185:27–39.

Schwarzkopf, L. & Alford, R.A. (1996) Desiccation and shelter-site use in a tropical amphibian: comparing toads with physical models. *Functional Ecology* 10:193–200.

Seebacher, F. & Alford, R.A. (1999). Movement and microhabitat use of a terrestrial amphibian (*Bufo marinus*) on a tropical island: seasonal variation and environmental correlates. *Journal of herpetology* 33:208–214.

Semlitsch, R.D. (2008) Differentiating migration and dispersal processes for pond-breeding amphibians. *The Journal of Wildlife Management* 72:260–267.

Shiau, T.W., Tsai, T.S., Tu, M.C. (2004). Preliminary Study of Thread Bobbin in Tracking Snakes. *BioFormosa* 39(1):7–13.

- Shoemaker, V.H., Hillman, S.S., Hillyard, S.D., Jackson, D.C., McClanahan, L.L., Withers, P.C. & Wygoda, M.L. (1992). Exchange of water, ions, and respiratory gases in terrestrial amphibians. In: Feder, M.E. & Burggren, W.W. (Ed.). *Environmental Physiology of the Amphibians*, pp. 125–150. Chicago: The University of Chicago Press.
- Simberloff, D. & Dayan, T. (1991). The guild concept and the structure of ecological communities. *Annual review of ecology and systematics* 22:115–143.
- Sinsch, U. (1988a). Seasonal changes in the migratory behavior of the toad *Bufo bufo*, direction and magnitude of movements. *Oecologia* 76:390–398.
- Sinsch, U. (1988b). Temporal spacing and breeding activity in the natterjack toad, *Bufo calamita*. *Oecologia* 76: 399–407.
- Sinsch, U. (1990). Migration and orientation in anuran populations. *Ethology, Ecology, and Evolution* 2: 65–79.
- Somaweera, R. & Shine, R. (2012). The (non) impact of invasive cane toads on freshwater crocodiles at Lake Argyle in tropical Australia. *Animal Conservation*, 15(2):152–163.
- Spencer, S.R., Cameron, G.N. & Swihart, R.K. (1990). Operationally defining home range: temporal dependence exhibited by hispid cotton rats. *Ecology* 71(5):1817–1822.
- Steinwald, M.C., Swanson, B.J. & Waser, P.M. (2006). Effects of spool-and-line tracking on small desert mammals. *The Southwestern Naturalist* 51(1):71–78.
- Stott, P. (1987) Terrestrial movements of the fresh-water tortoise *Chelodina longicollis* shaw as monitored with a spool tracking device. *Australian Wildlife Research* 14:559–567.
- Tattersall, G.J., Eterovick, P.C. & Andrade, D.V. (2006). Tribute to R. G. Boutilier: Skin colour and body temperature changes in basking *Bokermannohyla alvarengai* (Bokermann 1956). *Journal of Experimental Biology* 209:1185–1196.
- Toledo, L.F., Zina, J. & Haddad, C.F.B. (2003). Distribuição espacial e temporal de uma comunidade de anfíbios do Município de Rio Claro, São Paulo, Brasil. *Holos Environment* 3(2):136–149.
- Tozetti, A.M. (2006). Uso do ambiente, atividade e ecologia alimentar da cascavel (*Crotalus durissus*) em área de Cerrado na região de Itirapina, SP. Tese (Doutorado em Zoologia) Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Tozetti, A.M. & Toledo, L.F. (2005). Short-term movement and retreat sites of *Leptodactylus labyrinthicus* (Anura: Leptodactylidae) during the breeding season: a spool-and-line tracking study. *Journal of herpetology* 39:640–644.
- Tozetti, A.M. & Martins, M. (2007). A technique for external radio-transmitter attachment and the use of thread-bobbins for studying snake movements. *South American Journal of*

Herpetology 2:184–190.

Tozetti, A.M., Vettorazzo, V. & Martins, M. (2009). Short-term movements of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus*) in southeastern Brazil. *The Herpetological Journal* 19:201–206.

Vieira, E.M., Iob, G., Briani, D.C. & Palma, A.R.T. (2005). Microhabitat selection and daily movements of two rodents (*Necomys lasiurus* and *Oryzomys scotti*) in Brazilian Cerrado, as revealed by a spool-and-line device. *Mammalian Biology* 70(6):359–365.

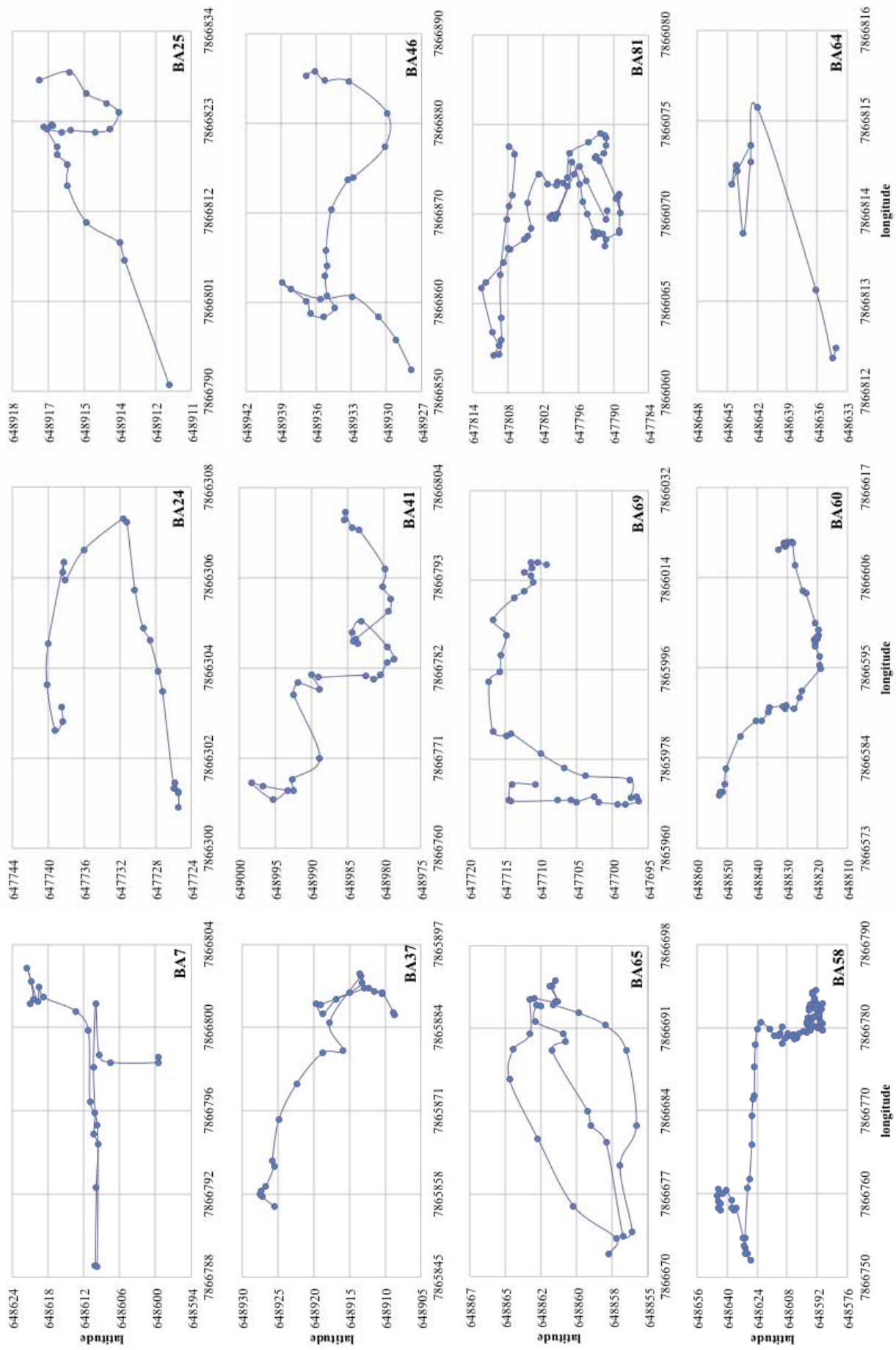
Webb, J.K. & Shine, R. (1998). Using thermal ecology to predict retreat-site selection by an endangered snake species. *Biological Conservation* 86(2):233–242.

White, G.C. & Garrott, R.A. (1990). *Analysis of Wildlife Radio-Tracking Data*. San Diego: Academic press San Diego.

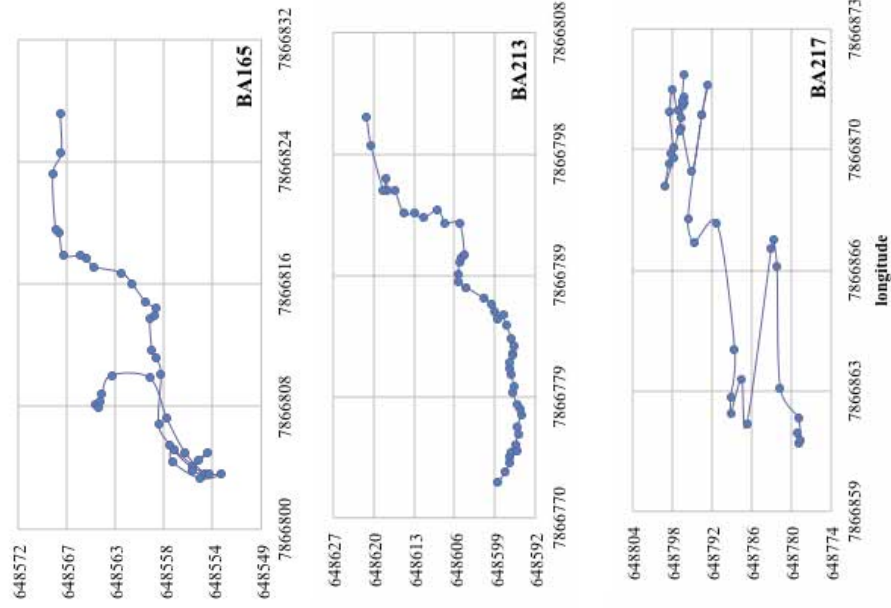
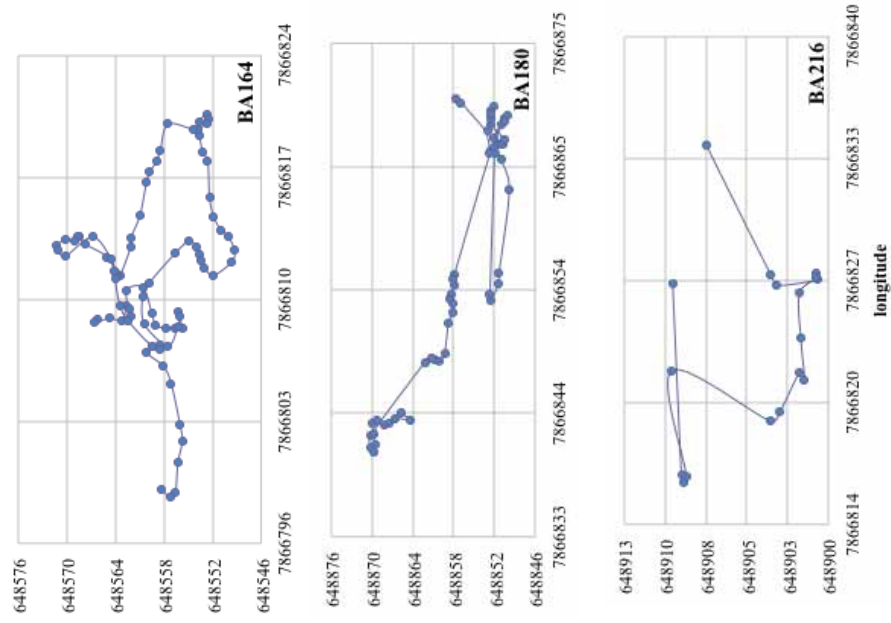
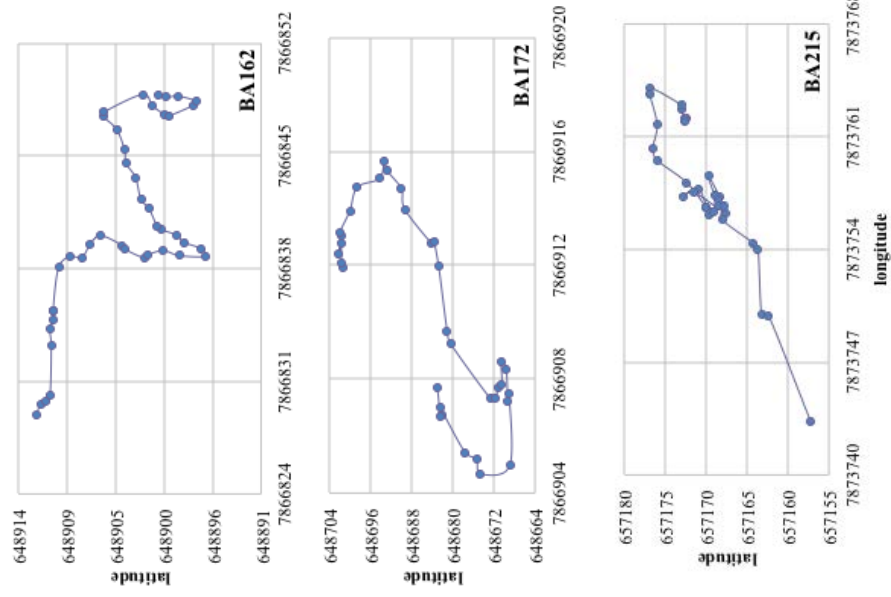
Apêndice 1. Descrição dos modelos utilizados para avaliar a influência das variáveis climáticas nos padrões de abundância sazonal de *Bokermannohyla alvarengai* na Serra do Cipó. AIC: critério de informação de Akaike; AIC_c: valor do critério de Akaike ajustado para pequenas amostras (menores valores indicam modelos mais parcimoniosos); ΔAIC_c: diferença entre AIC_c do respectivo modelo e do modelo mais parcimonioso); ωAIC_c: peso de AIC_c (maiores valores indicam maior probabilidade de parcimônia).

Modelo	pluviosidade	vento	umidade	temperatura	estação (var)	período (var)	transecto (var)	estação (std)	período (std)	transecto (std)	k	n	AIC	AIC _c	ΔAIC _c	ωAIC _c
0					0,040	0,20	0,66	0,21	0,45	0,81	4	48	225,6	226,53	4,00	0,047
1	-1,884				0,020	0,22	0,67	0,15	0,47	0,81	5	48	221,1	222,53	0,00	0,344
2		1,624			0,080	0,16	0,55	0,28	0,40	0,74	5	48	225,1	226,53	4,00	0,047
3			1,259		0,070	0,09	0,62	0,26	0,29	0,79	5	48	226,0	227,43	4,90	0,030
4				-1,558	0,005	0,05	0,58	0,07	0,24	0,76	5	48	225,8	227,23	4,70	0,033
5	-1,828		0,946		0,030	0,13	0,64	0,17	0,36	0,80	6	48	222,3	224,35	1,82	0,139
6	-1,709	1,162			0,050	0,19	0,57	0,22	0,44	0,76	6	48	221,9	223,95	1,42	0,169
7	-1,711			-0,831	0,004	0,11	0,62	0,06	0,33	0,78	6	48	222,6	224,65	2,12	0,119
8		1,511	1,125		0,100	0,07	0,52	0,32	0,28	0,72	6	48	226,0	228,05	5,52	0,022
9		1,397		-1,182	0,040	0,06	0,50	0,20	0,25	0,71	6	48	226,0	228,05	5,52	0,022
10			0,306	-0,703	0,018	0,06	0,59	0,13	0,24	0,77	6	48	227,7	229,75	7,22	0,009
11		1,422	0,396	-0,417	0,070	0,06	0,51	0,26	0,25	0,71	7	48	227,8	230,60	8,07	0,006
12	-1,610	0,985	0,477	-0,164	0,040	0,11	0,55	0,21	0,34	0,74	8	48	225,3	228,99	6,46	0,014

Apêndice 2. Deslocamento dos indivíduos de *Bokermannohyla alvarengai* rastreados por meio da técnica do carretel de linha na Serra do Cipó.

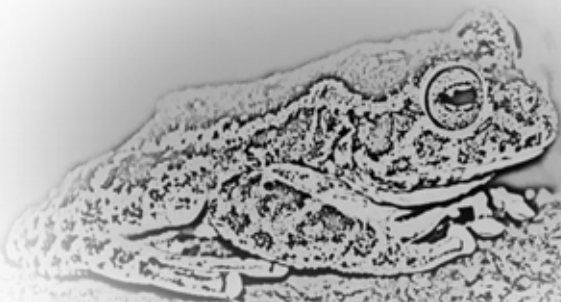


Apêndice 2. Cont.



CAPÍTULO III

A dinâmica da termorregulação em *Bokermannohyla alvarengai* (Anura, Hylidae): inter-relações entre a ecologia termal e o balanço hídrico



A dinâmica da termorregulação em *Bokermannohyla alvarengai* (Anura, Hylidae): inter-relações entre a ecologia termal e o balanço hídrico

RESUMO. Alguns anuros, apesar de pouco comum em função do elevado risco de desidratação, são conhecidos por fazerem uso prolongado do assoalhamento com finalidade termorregulatória, podendo inclusive ocorrer em locais distantes de corpos d'água. O assoalhamento, quando em condições privadas de umidade, é geralmente acompanhado por adaptações especializadas para reduzir a perda de água durante a exposição à radiação solar. Este é o caso de *Bokermannohyla alvarengai*, um hílideo que assoalha acompanhado por mudanças fisiológicas na coloração da pele, as quais modulam as trocas de calor entre animal e ambiente. Embora relativamente conhecido, o assoalhamento na espécie ainda carece de um estudo detalhado que caracterize o comportamento identificando potenciais influências de fatores bióticos/abióticos e possíveis conflitos ecológicos e/ou funcionais, e este foi o objetivo do presente estudo. Para tanto, investigamos de forma ampla parâmetros ecofisiológicos buscando entender a interação animal-ambiente com base em suas capacidades fisiológicas frente aos elementos abióticos desafiadores do meio no qual vive, os campos rupestres. O assoalhamento em *B. alvarengai* envolve um delicado balanço entre controle da temperatura corpórea (T_b) e equilíbrio hídrico. Nossos dados revelaram que a T_b em animais em condição de assoalhamento é significativamente maior em relação aos animais abrigados, sendo a elevação da T_b influenciada apenas pelas variáveis radiação solar incidente e temperatura do substrato. A maioria dos animais foi encontrada no microambiente de maior amplitude térmica, justamente o que confere as maiores oportunidades de termorregulação. Os animais apresentaram temperatura crítica (cloacal) mínima de 5,6°C e máxima de 36,5°C, valores compatíveis tanto com a temperatura operacional (T_e) como com o intervalo térmico no qual a espécie é encontrada ativa na natureza. Apesar de não configurar uma espécie verdadeiramente à prova d'água, *B. alvarengai* apresenta taxas de perda evaporativa de água (PEA) relativamente baixas e elevada capacidade de absorção de água, 40 vezes maior do que as taxas de PEA. O volume máximo de armazenamento de água na bexiga urinária de *B. alvarengai* neste estudo foi de 14,3% da massa corpórea. Nossos dados demonstram que estes ajustes fisiológicos é quem dão suporte ao comportamento de assoalhar na espécie, principalmente considerando-se as restrições hídricas dos campos rupestres. Mais do que conhecer as capacidades/limitações fisiológicas de *B. alvarengai*, este estudo contribui para o entendimento

das implicações ecológicas e evolutivas do comportamento de assoalhar em anfíbios, além de importante para o delineamento de medidas de conservação dessas espécies na natureza.

INTRODUÇÃO

A exploração de ambientes terrestres pelos anfíbios, especialmente ambientes mais áridos, depende de adaptações morfológicas, fisiológicas e comportamentais a fim de reduzir a perda de água por evaporação (Barbeau e Lillywhite, 2005; Jared et al., 2005). Neste sentido, considerando-se os requerimentos fisiológicos e reprodutivos dos anuros, a formação do cerrado brasileiro denominada “campos rupestres” poderia ser considerada um ambiente desafiador para o estabelecimento do grupo devido às suas características climáticas peculiares como grande amplitude térmica diária, baixa umidade relativa do ar e forte sazonalidade de chuvas, além das condições restritivas do solo (i.e. baixa disponibilidade de água). Apesar disso, os campos rupestres representam uma unidade biológica única por sua notável riqueza de espécies e endemismos (Heyer, 1999), sugerindo que as particularidades do ambiente podem ter resultado em adaptações locais.

Bokermannohyla alvarengai (Bokermann, 1956) é uma espécie de hilídeo endêmico dos campos rupestres conhecida por passar longos períodos do dia repousando em rochas completamente exposta à radiação solar (Sazima e Bokermann, 1977). O assoalhamento em anfíbios, contudo, é considerado raro (cf. Hutchison e Dupré, 1992), pois a alta permeabilidade do tegumento não representa uma barreira significativa para o risco de dessecação inerente ao comportamento (Jameson, 1966; Shoemaker et al., 1992). Em geral, a maioria das espécies de anuros que assoalham, assoalham em substratos úmidos, parcialmente submersos, ou ainda próximos a corpos d’água alternando entre o meio aquático e terrestre (Brattstrom, 1963, 1979; Lillywhite, 1970; Seymour, 1972). Outras espécies, no entanto, assoalham em condições privadas de umidade apresentando adaptações especializadas para reduzir a perda de água durante a exposição à radiação solar (e.g. Loveridge, 1970; Shoemaker et al., 1972; Lillywhite, 1975; Shoemaker e McClanahan, 1975; Blaylock et al., 1976; McClanahan et al., 1978; Withers et al. 1982; Kobelt e Linsenmair, 1986; Schmuck et al., 1988; Wygoda, 1988; Kaul e Shoemaker, 1989; Snyder e Hammerson, 1993; King et al., 1994; Withers, 1995; Lillywhite et al. 1997; Lillywhite et al., 1998; Stegen et al., 2004; Barbeau e Lillywhite, 2005).

O assoalhamento em *B. alvarengai* pode ocorrer em locais distantes de corpos d’água e é acompanhado por uma dramática mudança fisiológica na coloração da pele, a qual é importante para modular a troca de calor dos animais (Tattersall et al., 2006). Embora

relativamente conhecidos (ver Bokermann, 1964; Sazima e Bokermann, 1977; Eterovick e Sazima, 2004), estes aspectos peculiares da ecologia de *B. alvarengai* ainda carecem de um estudo detalhado que caracterize o contexto de sua ocorrência sob condições naturais e identifique as potenciais interações com fatores bióticos e abióticos, bem como possíveis conflitos ecológicos e/ou funcionais. Estas questões são aqui abordadas por meio de uma ampla amostragem de *B. alvarengai* para a qual obtivemos informações sobre parâmetros de cunho ecológico e fisiológico dentro do contexto em que os animais são encontrados na natureza. Ademais, como os compromissos potenciais envolvendo o comportamento de assoalhar, a regulação da temperatura corpórea e manutenção de um balanço hídrico adequado são integrados com as capacidades fisiológicas específicas da espécie, foram investigados em laboratório onde determinamos a tolerância térmica e taxas de perda evaporativa e absorção de água em *B. alvarengai*.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

Campos rupestres é uma fitofisionomia do Cerrado que ocorre acima de 1000 m de altitude caracterizada por maciços rochosos, solos oligotróficos e formações herbáceo-arbustivas tipicamente xeromórficas, sujeita a grandes oscilações diárias de temperatura, exposição ao vento e restrições hídricas (Joly, 1970; Eiten, 1978; Giuliatti et al., 1987; Furley, 1999; Giuliatti et al., 1997). É considerado um centro de endemismo e especiação para diversos grupos de animais, constituindo também uma das vegetações brasileiras mais conspícuas e reconhecidas pela notável riqueza de formas endêmicas (Giuliatti et al., 1987; Giuliatti e Pirani, 1988; Giuliatti et al., 1997; Heyer 1999; Leite et al., 2008; Rapini et al., 2008; Vasconcelos et al., 2008). Abriga grande diversidade de anfíbios anuros sendo a maioria do conhecimento sobre as espécies concentrada na Serra do Cipó, região localizada ao sul da Cadeia do Espinhaço no estado de Minas Gerais (Eterovick e Sazima, 2004; Leite et al., 2008).

Este estudo foi realizado entre maio de 2011 e fevereiro de 2013 em uma área de campo rupestre na Serra do Cipó (19°12' a 19°20'S; 43°30' a 43°40'W), amostrando todas as estações do ano. A região apresenta clima mesotérmico (Cwb) segundo a classificação climática de Köppen (Köppen, 1900), com estações bem definidas. A alta sazonalidade é marcada com períodos chuvosos ocorrendo de outubro a março com médias de temperatura mínima de 12,5°C, máxima de 29,6°C e 288 mm de pluviosidade média. Períodos de seca ocorrem entre abril e setembro com médias de temperatura mínima de 8,6°C, máxima de 26,8°C e 33 mm de

pluviosidade média.

Amostragem dos animais e parâmetros de campo

Para cada indivíduo de *B. alvarengai* encontrado em campo, registramos data e horário do encontro, comprimento rostro-cloacal (mm; CRC), massa corpórea (g), sexo (somente indivíduos adultos), temperatura corpórea superficial (T_b) e do substrato (T_s) (termômetro infravermelho, resolução 0,1°C), variáveis climáticas como temperatura do ar, umidade relativa, velocidade do vento e luminosidade (modelo Extech instruments 45170), microambiente (sobre rocha, em fenda de rocha, vegetação e água) e tipo de atividade (ativo, assoalhando ou abrigado do sol). Após a tomada dos dados os animais foram soltos no local de captura. Para os experimentos de laboratório, alguns indivíduos foram coletados e transportados para o laboratório no Departamento de Zoologia da Universidade Estadual Paulista (UNESP - Rio Claro). Os animais foram mantidos em terrários com abrigos e água disponível *ad libitum*, e alimentados com grilos e tenébrios até a execução de todos os experimentos, o que ocorreu em no máximo 15 dias após a coleta dos animais. A captura, coleta e transporte dos animais foram realizados sob a licença de coleta SISBIO nº 22170-1/2010, e os indivíduos coletados depositados na Coleção de Anfíbios da Universidade Estadual Paulista, Rio Claro (CFBH).

Caracterização do microclima

Para descrever a amplitude térmica do ambiente e caracterizar a temperatura dos diferentes microambientes potencialmente disponíveis para a ocupação por *B. alvarengai* (temperatura operacional, T_e), utilizamos modelos físicos. Os modelos simulam as propriedades térmicas de um animal em equilíbrio térmico com o ambiente, ou seja, a T_e corresponde à T_b na ausência de mecanismo termorregulatório (Bakken e Gates, 1975; Bakken, 1992; Bartelt e Peterson, 2004; Dzialowski, 2005). O regime térmico de todos os microambientes (ver detalhes sobre seleção de microambiente no capítulo 2) nas diferentes estações do ano foi obtido por modelos confeccionados a partir de espuma fenólica, em tamanho e formato compatíveis com *B. alvarengai* em postura de conservação de água. Os modelos foram mantidos em um recipiente contendo água e em cada modelo, foi inserido um *logger* de temperatura (TidBit, HOBO Onset Computer Co.) com leitura a cada 15 minutos. Duas tonalidades, clara e escura, foram utilizadas em cada tipo de ambiente a fim de simular a variação real da temperatura em função da coloração dos indivíduos (Figura 1; ver capítulo 4 para mudanças na coloração da pele). Para o microambiente água, o Tidbit foi mantido diretamente dentro da água em riacho. A espuma fenólica foi previamente testada neste estudo apresentando propriedades térmicas semelhantes aos modelos de ágar e gesso, modelos precisos na obtenção de T_e e perda

evaporativa de água em uma variedade de condições ambientais (cf. Navas e Araujo, 2000; Tracy et al., 2007). Optou-se pelo uso da espuma fenólica devido ao melhor desempenho no tipo de ambiente amostrado (campo rupestre) e pela praticidade de manutenção em campo.

Tolerância a temperaturas críticas

A tolerância térmica foi investigada em indivíduos por meio da determinação das temperaturas críticas mínima e máxima (TC_{min} e TC_{max}). Tais críticos, em geral, são determinados pela variação rápida da temperatura corpórea (rápida o suficiente para que não haja tempo para ocorrência de mecanismos de compensação) até que algum indicador pré-estabelecido seja atingido. Embora este indicador possa ser a morte de fato do animal, mais comumente utiliza-se a perda do controle motor como um indicador de “morte ecológica”. Aqui, definimos a morte ecológica como a incapacidade dos animais em voltarem à posição normal após terem sido colocados em decúbito dorsal (ver Lutterschmidt e Hutchison, 1997; Navas et al., 2007).

Inicialmente, os animais foram avaliados quanto à tolerância a temperatura crítica mínima e, posteriormente, à crítica máxima, respeitando um intervalo de dois dias entre os procedimentos. Os experimentos foram realizados utilizando-se uma estufa tipo B.O.D. (Eletrolab - modelo EL 101/2RS), com controlador de temperatura digital microprocessado. Para a determinação da temperatura crítica mínima o experimento foi iniciado em 20°C e a temperatura progressivamente reduzida na taxa de 1°C a cada 10 minutos. Para a determinação da temperatura crítica máxima, o experimento foi iniciado a 20°C, com a temperatura sendo elevada também na taxa de 1°C a cada 10 minutos. O experimento foi suspenso e concluído com a perda do controle motor nos animais, e T_b e a temperatura cloacal (T_c) imediatamente aferidas com termômetro infravermelho e termômetro de leitura rápida (resolução 0,1°C) inserido na cloaca, respectivamente.



Figura 1. Modelos físicos para a caracterização do microclima nos diferentes microambientes ocupados por *Bokermannohyla alvarengai*. **A.** sobre rocha; **B.** fenda de rocha; **C.** vegetação.

Perda evaporativa de água e resistência da pele

As taxas de perda evaporativa de água (PEA) e resistência da pele (R_s) foram medidas em animais 100% hidratados em três diferentes temperaturas: 20, 25 e 30°C. Previamente aos experimentos, os animais foram mantidos por um período de duas horas na temperatura experimental, em recipientes plásticos contendo água de modo a manter toda a superfície ventral úmida. Foram então cuidadosamente secos com papel absorvente, pesados em balança de precisão (0,0001 g) e transferidos para uma câmara hermeticamente fechada (1000 ml) dentro de uma estufa B.O.D. na temperatura correspondente. As medições foram imediatamente iniciadas prosseguindo até a estabilização das leituras (± 1 hora de experimento) e a obtenção de um período de registro constante (*steady-state*) por pelo menos 30 minutos. Ao final dos registros, os animais foram retirados das câmaras, a T_b obtida com termômetro infravermelho, e pesados novamente. Apenas os resultados daqueles indivíduos em repouso e na postura de conservação de água foram considerados válidos. O mesmo procedimento foi realizado em réplicas de ágar 1% confeccionadas conforme Navas e Araujo (2000), para cada animal analisado. Modelos de ágar perdem água à taxas equivalentes à uma superfície de água livre, ou seja, não apresentam qualquer resistência cutânea (modelos nulos), possibilitando assim avaliar a resistência da camada de vapor de água na superfície dos animais (Spotila e Berman, 1976; Wygoda, 1984). Os modelos foram produzidos a partir de contra-moldes de alginato feitos com indivíduos da espécie de modo a manter o formato e tamanho similares aos animais analisados. Os procedimentos com as réplicas de ágar foram feitos imediatamente após o final dos experimentos com os animais.

As medições foram realizadas através de um sistema de bombas de ar associado a um fluxímetro de massa (modelo SS-4 Subsampler – Sable Systems) produzindo um fluxo de ar constante de $1,3 \text{ cm.s}^{-1}$ com umidade relativa controlada em 30% (modelo DC-4 Humidity & Dewpoint Controller – Sable Systems), o qual foi direcionado para duas câmaras distintas: uma vazia e uma contendo o espécime em experimento ou modelo de ágar. Após passagem pelas câmaras o ar foi encaminhado para um analisador de umidade relativa (modelo RH – 300 Humidity/Dewpoint Analyzer – Sable Systems) e a variação registrada com um sistema de aquisição de dados (modelo UI-2 Data Acquisition Interface – Sable Systems).

As taxas de PEA foram calculadas a partir da fórmula: $TD = F_a DVA_a - F_v DVA_v$, onde TD representa a taxa de perda de água por evaporação absoluta ($\mu\text{g.s}^{-1}$), F_a representa o fluxo de ar ($\text{cm}^3.\text{s}^{-1}$) na câmara contendo o animal/ágar, F_v na câmara vazia, e DVA_a e DVA_v representam a densidade do vapor de água ($\mu\text{g.cm}^{-3}$) do ar após ter passado pela câmara animal/ágar e vazia, respectivamente. A densidade do vapor de água foi calculada utilizando-

se a lei dos gases ideais (cf. Campbell, 1977) a partir da pressão de saturação de vapor de água e temperatura superficial do animal/água (para cálculos ver Nave, 2012). Considerando que animais em postura de conservação de água apresentam somente dois terços da superfície corpórea em contato com o ar (Withers et al., 1982), calculamos a porção de tegumento efetivamente exposta para cada animal. Para os cálculos de PEA por área de exposição (TDe), obtivemos primeiramente a área de superfície total conforme McClanahan e Baldwin (1969) através da fórmula: $AS = 9,9M^{0,56}$, onde AS corresponde a área de superfície total (cm^2) e M corresponde a massa corpórea (g). A área superficial exposta foi então calculada multiplicando-se AS por 0,667.

A resistência total à perda de água (R_t) pode ser calculada dividindo-se a diferença de densidade do vapor de água (ΔDVA) pela taxa de perda evaporativa de água (Spotila e Berman, 1976). Para o cálculo, utilizamos a fórmula: $R_t = DVA_s - DVA_a / TDe$, onde R_t representa a resistência total à perda de água por evaporação (s.cm^{-1}), DVA_s representa a densidade do vapor de água saturado na superfície do animal/água ($\mu\text{g.cm}^{-3}$), DVA_a a densidade do ar que deixa a câmara contendo o animal/água ($\mu\text{g.cm}^{-3}$), e TDe representa a taxa de perda de água por evaporação por área exposta ($\mu\text{g.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$). A resistência da pele (R_s) foi então calculada subtraindo R_t dos modelos de água pela R_t dos animais (ver Spotila e Berman, 1976; Wygoda, 1984).

Taxas de absorção de água

Os experimentos de absorção foram realizados apenas na temperatura 25°C imediatamente após as medições de perda evaporativa de água e resistência da pele. Ao saírem das câmaras de medição os animais foram pesados em balança de precisão (0,0001 g) e transferidos para câmaras vazias contendo água no fundo (de modo a manter somente a superfície ventral dos animais em contato com a água) por um período de 2 minutos. Foram então cuidadosamente secos com papel absorvente e pesados novamente. O procedimento foi repetido por mais cinco vezes. As taxas de absorção a partir de água livre (R_H) foram calculadas por meio do ganho de massa corpórea dos animais em função do tempo ($\mu\text{gH}_2\text{O}.\text{s}^{-1}.\text{cm}^{-2}$), considerando-se apenas um terço da área de superfície total.

Armazenamento de água

Para determinar a capacidade de armazenamento da bexiga urinária utilizamos o volume médio de urina de seis animais, mantidos individualmente em terrários com recipiente contendo água livre por pelo menos 2 semanas em temperatura constante para aclimação. Ao início do experimento, os animais foram pesados nas primeiras horas da manhã em balança de precisão

(0,0001 g) para a obtenção da massa dos indivíduos hidratados. A bexiga foi então esvaziada com o auxílio da inserção de uma cânula na cloaca enquanto uma leve pressão era exercida sobre a região pélvica dos animais, e foram pesados novamente. Este procedimento foi realizado por três dias consecutivos para obtenção de um valor médio para cada indivíduo (cf. Ruibal, 1962; Claussen, 1974). A capacidade média de armazenamento foi calculada pela diferença entre a massa corpórea dos indivíduos hidratados e a massa após o esvaziamento da bexiga. Adicionalmente, dados de oito indivíduos que eliminaram líquido pela cloaca durante a manipulação em outras atividades (e.g. procedimentos em campo, experimentos de PEA, tolerância à temperaturas críticas), também foram utilizados para complementar os dados de armazenamento de água na bexiga urinária.

Análise de dados

Todos os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio-padrão. A temperatura corpórea superficial (T_b) foi comparada entre os animais em condição de assoalhamento e abrigada do sol utilizando-se modelos lineares mistos. As variáveis CRC, massa, temperatura do substrato, temperatura do ar, umidade relativa do ar e velocidade do vento foram utilizadas como fatores aleatórios já que também podem influenciar a T_b dos indivíduos. Os modelos foram gerados utilizando-se a função *lmer* com o pacote “lme4” (Bates, et al., 2013). Os modelos físicos foram analisados através de two-way ANOVA com o tipo de microambiente (sobre rocha, em fenda de rocha, vegetação e água) como um tratamento e tonalidade dos modelos (clara e escura) como o segundo tratamento. As taxas de PEA e R_s foram comparadas por one-way ANOVA entre as três diferentes temperaturas (20, 25 e 30°C). A relação entre massa corpórea e taxas de absorção (R_H) foi testada por correlação de Pearson. As análises foram realizadas com o programa estatístico R 3.1.0 (R Core Team, 2014). Para todas as análises, diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Durante os trabalhos de campo, no período diurno (06:00–18:00 horas), a temperatura do ar variou entre 17,8 e 34,9°C, umidade relativa 27–87% e velocidade do vento 0–5,0 m/s. No período noturno (18:00–06:00 horas), a temperatura do ar foi de 14,5–28°C, umidade relativa 22–92% e velocidade do vento 0–6,6 m/s. No total, registramos 224 animais em campo dos quais 163 encontravam-se em atividade durante o período noturno e 61 foram capturados inativos durante o dia, sendo que 24 estavam assoalhando e 37 abrigados (Tabela 1). O CRC e

a massa corpórea dos indivíduos capturados em campo variaram de 17,4–126,6 mm e 0,6–143 g, respectivamente.

Tabela 1. Umidade relativa do ar (%), temperatura do ar, do substrato e corpórea (°C) de indivíduos de *Bokermannohyla alvarengai* na Serra do Cipó. Valores correspondem a média $\pm$ desvio-padrão, amplitude entre parênteses.

	ativos (n = 163)	abrigados (n = 37)	assoalhando (n = 24)
umidade relativa do ar	67,5 $\pm$ 11,5 (22,5–92,0)	51,5 $\pm$ 12,1 (27,0–87,0)	50,4 $\pm$ 9,9 (32–65,5)
temperatura do ar	20,2 $\pm$ 2,98 (14,5–28,0)	26,3 $\pm$ 4,22 (17,8–34,9)	25,7 $\pm$ 2,21 (22,2–30,8)
temperatura substrato	17,4 $\pm$ 3,06 (10,2–26,2)	21,8 $\pm$ 4,34 (12,6–30,2)	25,1 $\pm$ 4,62 (18,6–35,2)
temperatura corpórea	16,8 $\pm$ 2,95 (9,6–24,4)	21,7 $\pm$ 4,48 (12,4–31,8)	25,1 $\pm$ 4,72 (18,4–36,2)

Relações térmicas

As análises dos modelos lineares mistos, gerados para avaliar a influência das variáveis bióticas e abióticas sobre a T_b dos animais, indicaram que apenas a temperatura do substrato (T_s) exerceu um efeito adicional à condição de exposição dos animais ($t = -2,149$); as demais variáveis não foram expressivas para explicar a variação da T_b . Ou seja, a condição de exposição, por si só, pode ser considerada um bom preditor da temperatura corpórea superficial em *B. alvarengai*, sendo significativamente diferente entre animais em comportamento de assoalhamento e animais abrigados do sol ($t = -3,00$, $p = 0,004$).

A temperatura operacional (T_e) registrada na área de estudo durante as coletas variou de 9,3 a 28,7°C (Tabela 2; Figura 2), apresentando variação entre as estações amostradas (Figura 3). Os modelos físicos nos quatro microambientes apresentaram diferença significativa (two-way ANOVA, $F_{3,28} = 3,7724$, $p = 0,027$), mas apenas água diferiu dos demais microambientes (Tabela 3). Não houve diferença significativa entre modelos físicos claros e escuros (two-way ANOVA, $F_{3,28} = 0,1205$, $p = 0,732$). Os modelos sobre rocha apresentaram as temperaturas mais baixas assim como as mais altas, conferindo a maior amplitude térmica, ao passo que os modelos alocados em fenda de rocha apresentaram a menor amplitude térmica observada. O

logger de temperatura mantido na água registrou temperatura média mais elevada em relação aos demais microambientes, assim como valor de temperatura mínima superior.

A temperatura crítica mínima e máxima de *B. alvarengai* foi determinada em 12 indivíduos adultos, com massa corpórea variando de 14 a 88 g ($50,8 \pm 24,87$) e 49,4–108,6 mm de CRC ($83,1 \pm 16,13$). A média da TC_{min} foi de $5,6^{\circ}\text{C}$ e TC_{max} de $36,5^{\circ}\text{C}$, a partir da temperatura cloacal dos animais (Tabela 4; Figura 4).

Tabela 2. Temperatura operacional (T_e) registrada nos quatro microambientes disponíveis (água, sobre rocha, em fenda de rocha e vegetação) para *Bokermannohyla alvarengai* na Serra do Cipó, nos dois padrões de coloração (claro e escuro). Valores correspondem a média $\pm$ desvio-padrão, amplitude entre parênteses.

	modelo claro	modelo escuro
sobre rocha	$16,8 \pm 3,90$ (9,4–28,7)	$17,0 \pm 4,02$ (9,3–27,9)
fenda rocha	$17,0 \pm 2,19$ (11,8–24,5)	$16,8 \pm 2,18$ (11,7–24,6)
vegetação	$17,3 \pm 3,06$ (10,8–25,7)	$16,9 \pm 3,26$ (9,9–25,5)
água	$19,7 \pm 2,67$ (14,3–26,9)	

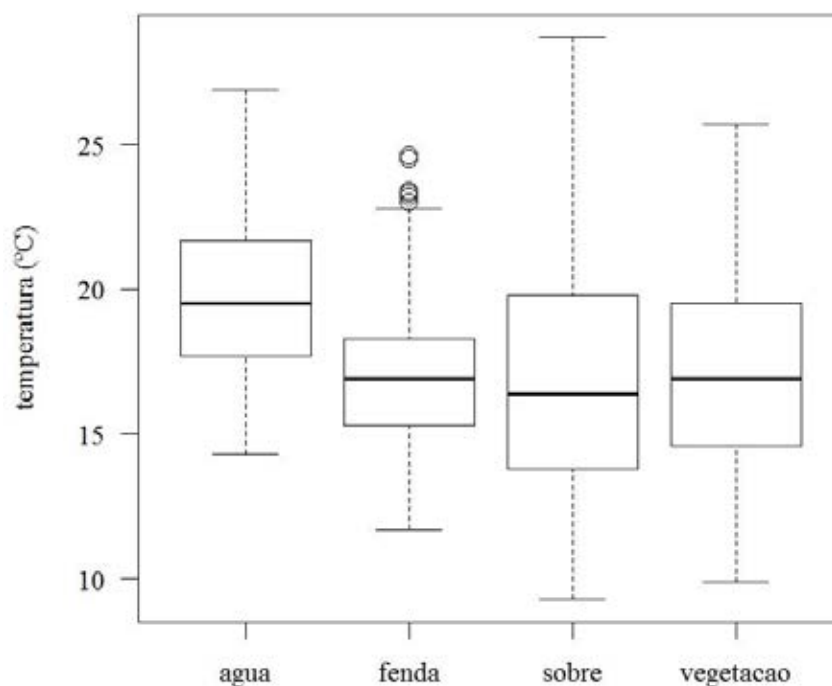


Figura 2. Temperatura operacional (T_e) registrada nos quatro microambientes disponíveis (água, sobre rocha, em fenda de rocha e vegetação) para *Bokermannohyla alvarengai* na Serra do Cipó, considerando os dois padrões de coloração. Linha central = mediana; limites das caixas = 1° e 3° quartis (25 a 75% da variação dos dados); linhas verticais = valores mínimos e máximos.

Tabela 3. Comparação da temperatura operacional (T_e) entre os microambientes disponíveis (água, sobre rocha, em fenda de rocha e vegetação) para *Bokermannohyla alvarengai* na Serra do Cipó. * indica diferença significativa.

	água	sobre rocha	fenda rocha
sobre rocha	0,002*	-	-
fenda rocha	0,020*	0,240	-
vegetação	0,007*	0,521	0,584

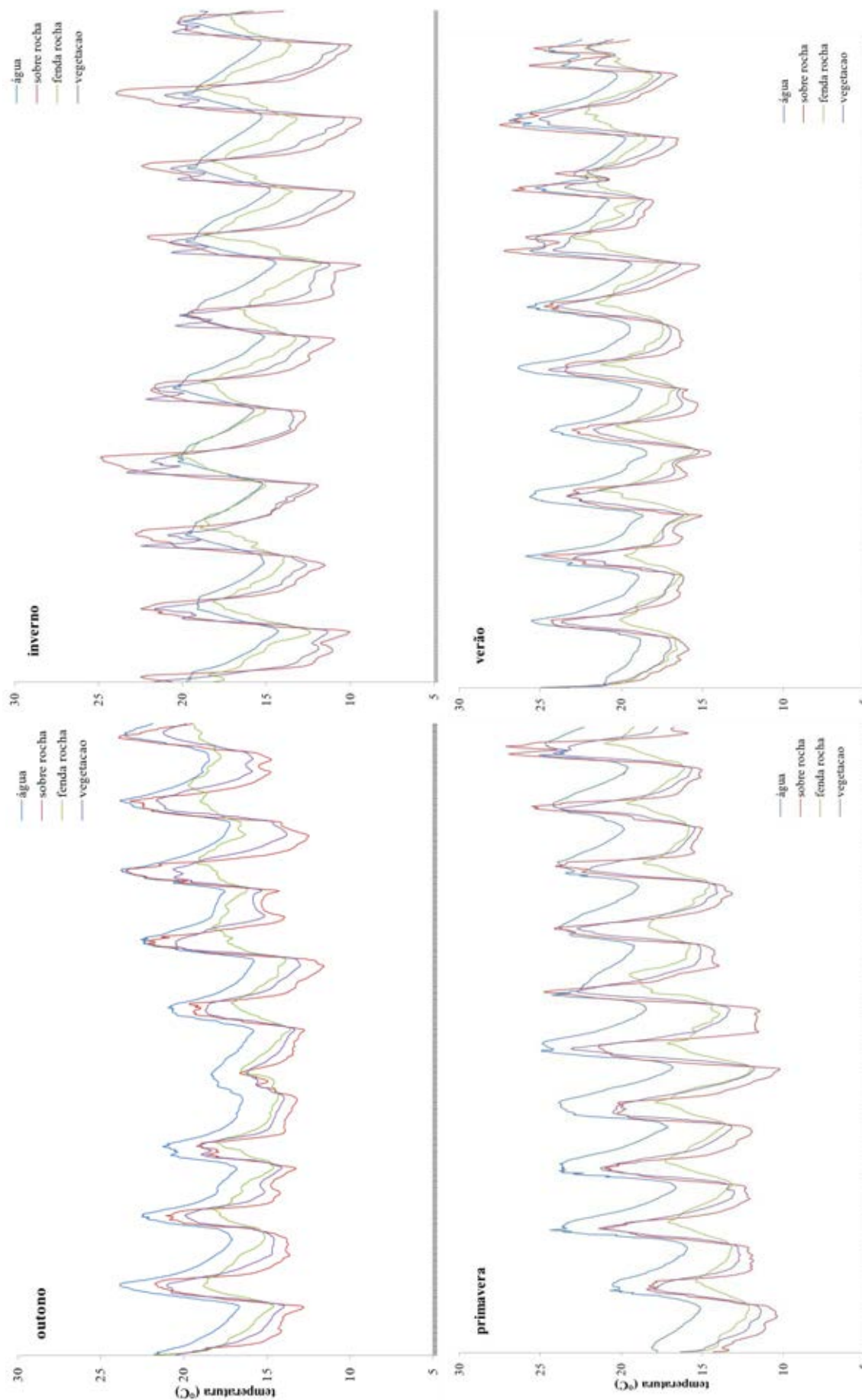


Figura 3. Variação da temperatura operacional (T_e) registrada nos quatro microambientes disponíveis (água, sobre rocha, em fenda de rocha e vegetação) na Serra do Cipó, amostrada em diferentes estações do ano.

Tabela 4. Temperatura crítica mínima e máxima para *Bokermannohyla alvarengai*. T_a : temperatura ambiente (estufa), T_b : temperatura corpórea, T_c : temperatura cloacal.

indivíduo	CRC (mm)	massa (g)	temperatura crítica mínima (°C)			temperatura crítica máxima (°C)		
			T_a	T_b	T_c	T_a	T_b	T_c
BA77	91,4	70,4	0,0	3,8	4,7	47,0	37,9	37,7
BA113	77,1	46,6	3,5	6,6	7,2	46,0	36,8	36,6
BA114	77,5	30,1	0,1	3,3	4,5	42,0	35,4	36,1
BA170	108,6	85,1	1,1	2,3	4,4	42,2	35,5	37,6
BA201	82,8	53,0	1,0	5,0	5,8	49,1	35,9	36,4
BA203	79,2	39,0	3,0	4,8	4,9	46,1	36,1	36,2
BA204	93,8	73,0	3,0	6,1	6,1	42,1	34,4	36,5
BA205	49,4	14,0	3,0	6,9	8,0	46,1	39,0	36,7
BA206	98,8	60,6	3,5	6,2	5,8	42,1	34,2	35,8
BA208	64,4	25,0	4,0	6,3	8,4	47,0	36,0	35,5
BA209	77,9	25,1	1,0	4,2	4,2	43,2	34,8	36,5
BA216	96,8	88,0	1,1	1,8	3,2	42,2	37,2	36,6

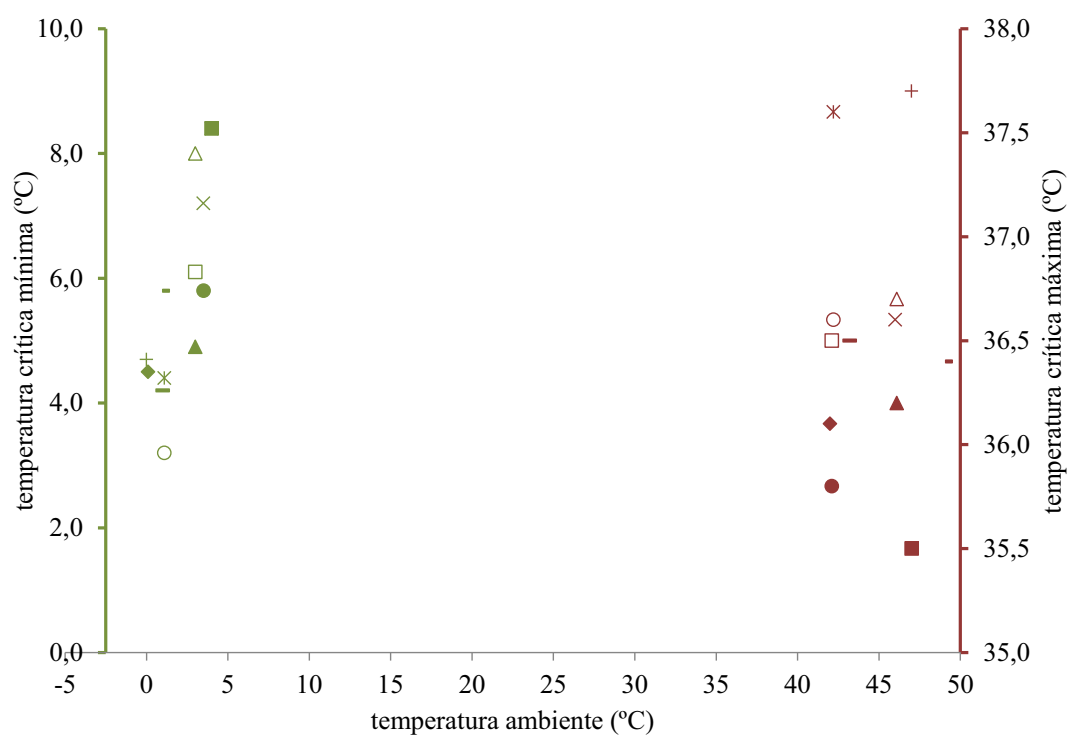


Figura 4. Temperatura crítica mínima (verde) e máxima (vermelho) em indivíduos de *Bokermannohyla alvarengai*. Valores relativos à temperatura cloacal.

Relações hídricas

As taxas de PEA em exemplares adultos de *B. alvarengai* aumentaram proporcionalmente com o aumento da temperatura (Tabela 5; Figura 5A) apresentando diferença significativa entre os tratamentos (ANOVA, $F_{2,35} = 13,1610$, $p < 0,001$). Contudo, as taxas de PEA foram diferentes apenas entre as temperaturas 20 e 30°C e entre 25 e 30°C ($p < 0,001$). A R_s à evaporação apresentou tendência à diminuição com o aumento da temperatura (Tabela 5; Figura 5B), sendo significativamente diferente entre os tratamentos (ANOVA, $F_{2,35} = 4,6581$, $p = 0,020$). Do mesmo modo que para PEA, apenas foi observada diferença entre as temperaturas 20 e 30°C ($p = 0,013$) e entre 25 e 30°C ($p = 0,011$).

As taxas de absorção a partir de água livre foram avaliadas em sete indivíduos adultos a 25°C, com valor médio de $67,60 \pm 35,63$ ($\mu\text{gH}_2\text{O} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$) (Tabela 6). Não foram observadas correlação entre massa corpórea e taxas de absorção ($t = -1,6017$, $p = 0,1701$).

A capacidade de armazenamento da bexiga urinária, determinada em 6 indivíduos adultos em laboratório, foi em média de $7,4 \pm 3,1\%$ da massa corpórea dos animais, enquanto que o volume de urina armazenada na bexiga urinária de oito indivíduos, coletado aleatoriamente, equivaleu em média à $10,6 \pm 3,0\%$ da massa corpórea (Tabela 7). O volume máximo de armazenamento de água na bexiga urinária de *B. alvarengai* neste estudo foi de 14,3% da massa corpórea.

Tabela 5. Taxas de perda evaporativa de água (PEA) e resistência da pele (R_s) em *Bokermannohyla alvarengai* a 20, 25 e 30°C. Valores correspondem a média $\pm$ desvio-padrão, amplitude entre parênteses.

	massa corpórea (g)	PEA ($\mu\text{gH}_2\text{O} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$)	R_s ($\text{s} \cdot \text{cm}^{-1}$)
20°C (n = 11)	$46,29 \pm 26,30$ (14,76–86,96)	$1,09 \pm 0,28$ (0,74–1,51)	$5,83 \pm 2,03$ (2,57–8,60)
25°C (n = 13)	$46,30 \pm 24,90$ (16,24–91,42)	$1,36 \pm 0,39$ (0,80–2,19)	$5,81 \pm 2,85$ (1,16–11,54)
30°C (n = 11)	$46,76 \pm 26,77$ (15,53–89,35)	$2,14 \pm 0,73$ (1,00–3,53)	$3,22 \pm 1,92$ (1,07–6,66)

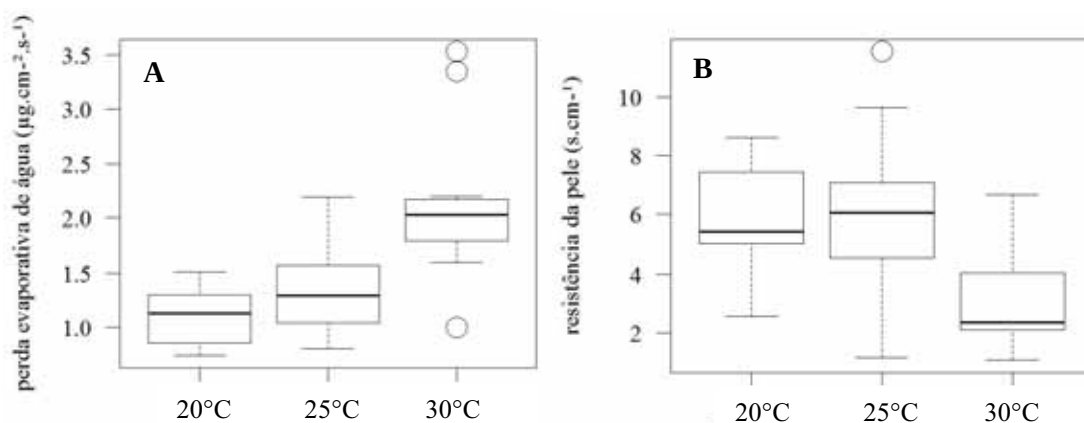


Figura 5. Taxas de perda evaporativa de água **(A)** e resistência da pele **(B)** em *Bokermannohyla alvarengai* a 20, 25 e 30°C.

Tabela 6. Taxas de absorção a partir de água livre (R_H) em *Bokermannohyla alvarengai* a 25°C. Valores correspondem a média $\pm$ desvio-padrão, amplitude entre parênteses.

massa corpórea (g)	R_H ($\mu\text{gH}_2\text{O}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$)
50,94 $\pm$ 28,02 (20,10–91,42)	67,60 $\pm$ 35,63 (30,63–112,14)

Tabela 7. Capacidade de armazenamento da bexiga urinária em indivíduos de *Bokermannohyla alvarengai*. Valores correspondem a média $\pm$ desvio-padrão, amplitude entre parênteses.

	massa corpórea (g)	volume de urina (%)
animais experimentais (n = 6)	55,8 $\pm$ 26,2 (25,0–88,0)	7,4 $\pm$ 3,1 (4,6–12,9)
dados complementares (n = 8)	38,6,8 $\pm$ 19,3 (15,2–70,4)	10,6 $\pm$ 3,0 (4,9–14,3)

DISCUSSÃO

De modo geral, os dados de T_b dos animais capturados em campo, encontrados em atividade, abrigados ou ainda assoalhando, demonstraram que existe grande amplitude térmica entre eles. Como esperado, as menores temperaturas corpóreas foram registradas em indivíduos em plena atividade, já que a espécie é estritamente noturna. Opostamente, indivíduos assoalhando apresentaram os maiores valores de T_b sendo significativamente superiores às dos animais encontrados abrigados durante o dia. Como demonstrado pelos modelos lineares mistos, os indivíduos em assoalhamento são capazes de elevar a T_b apenas com base na condição de exposição. As análises indicaram que a incidência direta da radiação solar é o principal componente que determina a variação da T_b dos indivíduos durante o período diurno em *B. alvarengai*. Este resultado parece corroborar os dados obtidos por Tattersall et al. (2006) em relação à importância do grau de incidência da radiação solar, onde temperatura ambiente representa um fator de influência secundária na regulação da T_b durante o assoalhamento em comparação com a intensidade de luz.

Vários são os benefícios promovidos pelo assoalhamento em anuros na alimentação, digestão, crescimento, locomoção, reprodução, síntese de vitamina D, controle de parasitas e sistema imunitário (Ridle, 1909; Seymour, 1972; Lillywhite et al., 1973; Casterlin e Reynolds, 1977; Brattstrom, 1979; Freed, 1980; Jorgensen, 1992; Rome et al., 1992). Apesar das inúmeras vantagens, capturamos durante o dia maior número de animais abrigados do sol, mesmo em condições climáticas favoráveis para o assoalhamento. Uma das razões para esta diferença na predisposição de alguns indivíduos em assoalhar poderia estar relacionada então com o estado alimentar já que a elevação da T_b preferida após a alimentação pode aumentar a eficiência digestória (cf. Greenwald e Kanter, 1979; Sievert e Andreadis, 1999; Blouin-Demers e Weatherhead, 2001). Entretanto, a resposta termofílica pós-prandial parece não ser determinante para o assoalhamento em indivíduos de *B. alvarengai* já que observamos conteúdo estomacal em menos de 40% dos casos de indivíduos assoalhando e cerca de 60% em indivíduos abrigados (obs. pessoal).

Poucos indivíduos foram observados com parasitas externos como carrapatos ($n = 3$) ou ainda miíase ($n = 1$), e o comportamento de assoalhar na espécie, como já observado em outros ectotérmicos (e.g. Cagle, 1950), poderia ser o principal agente na baixa incidência. Do mesmo modo, em indivíduos que foram necropsiados registramos nematódeos, *Ochoterenella esslingeri* (Nematoda: Onchocercidae) (Luciano Anjos, com. pessoal), em apenas um animal sugerindo também baixa incidência de parasitas internos. Entretanto, o comportamento de

assoalhar poderia configurar um *trade-off* neste caso já que ao mesmo tempo que beneficia os animais contra o parasitismo com elevação da T_b , expõe os indivíduos à maior transmissão considerando que os parasitas apresentam ciclo de vida indireto e as larvas (microfilárias) são transmitidas aos anfíbios através da picada de mosquitos durante o dia (Wong e Bundy, 1985; Lima et al., 2012). Porém, apesar do menor registro de animais assoalhando neste estudo, a baixa incidência de parasitas na população de *B. alvarengai* amostrada poderia ser um indício de que o assoalhamento na espécie auxilia os animais no controle de ecto e endoparasitas.

Ainda neste contexto, poderíamos considerar a relação do assoalhamento e a ocorrência/incidência da quitridiomíose em *B. alvarengai*. A quitridiomíose é uma doença infecciosa causada pelo fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), descrito em 1999 (Longcore et al., 1999) como um patógeno específico de anfíbios (Berger et al., 1998), apontada como uma das principais causas de declínios populacionais no mundo (Daszak et al., 2003; Skerratt et al., 2007; Young et al., 2007; e.g. Ron e Merino, 2000; Bosch et al., 2001; Waldman et al., 2001; Weldon e Preez, 2004; La Marca et al., 2005; Lips et al., 2006; Schloegel et al., 2006; Gewin, 2008). Sabe-se que a temperatura é um fator chave na determinação do resultado de interações patógeno-hospedeiro (Richards-Zawacki, 2010) e que, em geral, baixas temperaturas em elevadas altitudes favorecem a proliferação deste fungo (cf. Gründler et al., 2011). Ou seja, é provável que *Bd* ocorra nos campos rupestres e que *B. alvarengai* esteja susceptível à contaminação pela doença. Entretanto, se a T_b afeta a vulnerabilidade dos animais à quitridiomíose (Woodhams et al., 2003; La Marca et al., 2005; Richards-Zawacki, 2010), indivíduos de *B. alvarengai* poderiam ser capazes de evitar ou reduzir a gravidade da infecção através do assoalhamento com a elevação da T_b . De fato, a incidência do fungo na população estudada é baixa com apenas 6,3% dos animais infectados (obs. pessoal), indicando que, além dos benefícios no controle de parasitas, o assoalhamento poderia ser eficiente contra a quitridiomíose em *B. alvarengai*.

Os modelos físicos dispostos na área de estudo, utilizados com a finalidade de caracterizar o microclima dos diferentes ambientes ocupados por *B. alvarengai*, demonstraram algumas diferenças de temperatura, mas apenas água diferiu significativamente dos demais microambientes. Em um panorama geral, o riacho se caracteriza como um ambiente térmico mais estável, próprio do maior calor específico da água. Apesar disso, poucos indivíduos (< 5%) foram capturados dentro de algum corpo d'água, indicando baixa preferência pelo microambiente (ver capítulo 2 para detalhes). Ademais, a maioria destes animais foi registrada no período reprodutivo e, provavelmente, encontravam-se dentro da água em um momento precedente ao amplexo e postura. De maneira oposta, os modelos físicos mantidos sobre rocha

registraram tanto as mínimas como as máximas temperaturas conferindo a maior amplitude térmica observada. Este resultado provavelmente é decorrente da maior exposição às condições climáticas comparando-se com as demais situações, onde os modelos se encontram mais abrigados. Ainda assim, a maioria dos indivíduos foi registrada neste tipo de microambiente fortalecendo a ideia de que microclimas de maior estabilidade térmica não são determinantes na escolha do tipo de substrato em *B. alvarengai*.

Claramente, a permanência sobre o substrato rocha durante o período diurno confere aos animais maiores oportunidades de termorregulação através do assoalhamento. Animais assoalhando conseguem elevar a T_b quase 8°C acima da T_e máxima registrada neste tipo de microambiente, indicando que, de fato, a exposição direta dos animais à radiação solar se comporta como uma eficiente estratégia de termorregulação. Contudo, durante a noite, este tipo de substrato expõe os animais às menores temperaturas indicando que as desvantagens térmicas parecem ser compensadas por outros benefícios como, por exemplo, benefícios ecológicos onde haveria maior eficiência no forrageamento ao selecionar este microambiente.

Os valores de TC_{min} e TC_{max} encontram-se absolutamente dentro das temperaturas máximas (27,9°C, durante o verão) e mínimas (9,3°C, durante o inverno) registradas na área de estudo com os modelos físicos. Os valores também são compatíveis com o intervalo térmico no qual a espécie é encontrada em atividade na natureza, entre 9,6 e 24,4°C de T_b , embora a temperatura máxima durante o assoalhamento possa chegar muito próxima da TC_{max} (36,2°C em um caso). A TC_{max} registrada para *B. alvarengai* não parece ser significativamente diferente das temperaturas críticas geralmente encontradas em Hylidae (Navas et al., 2007). De fato, a TC_{min} desta espécie encontra-se muito próxima daquela predita com base apenas na latitude de ocorrência (~4,7°C; ver Wells, 2007). Por outro lado, a TC_{max} de *B. alvarengai* é consideravelmente menor do que àquela predita pela latitude (~41,5°C; Wells, 2007). Porém, estas predições não incorporam a variação altitudinal que sabidamente afeta a tolerância térmica. Em geral, anfíbios ocorrendo em regiões de altitude apresentam uma diminuição da TC_{max} (Brattstrom, 1968; Christian et al., 1988), justamente aquilo que observamos para *B. alvarengai*. Entretanto, este padrão não foi seguido pela TC_{min} e acreditamos que *B. alvarengai* talvez seja capaz de evitar a exposição à TC_{min} buscando abrigo em fendas de rochas. Finalmente, devemos considerar que a ocorrência de um padrão adaptativo entre a tolerância térmica e o regime termal do ambiente ocupado pelos anuros não é sempre clara (Wells, 2007). Esta incerteza, ademais, pode estar especialmente presente no caso de *B. alvarengai*, até mesmo pelo fato de que esta espécie é encontrada em ambientes de altitude relativamente moderada (~1.000 a 2.000 m) (Eterovick e Sazima, 2004).

O assoalhamento com finalidade termorregulatória em anuros torna-se mais efetivo em espécies com baixas taxas de PEA e, em casos extremos, naquelas denominadas de “à prova d’água” (Lillywhite, 1970; Tracy, 1976; Spotila et al., 1992; King et al., 1994), pois, de outra forma, o calor obtido via assoalhamento seria perdido devido ao resfriamento evaporativo. Contudo, as taxas de PEA em *B. alvarengai* foram significativamente maiores do que àquelas registradas em anuros à prova d’água, indicando que a espécie não pode ser considerada verdadeiramente à prova d’água, como já apontado por Tattersall et al. (2006). Por outro lado, as taxas foram menores do que àquelas que poderiam ser preditas com base na massa corpórea (cf. Wygoda, 1984), o que indica que a espécie, de fato, apresenta uma redução da permeabilidade do tegumento. As taxas de PEA obtidas em adultos de *B. alvarengai* (presente estudo) foram similares àquelas registradas em juvenis (Tattersall et al., 2006), indicando que a permeabilidade do tegumento não é alterada ontogeneticamente. Porém, a R_s à evaporação nos adultos foi expressivamente menor em relação aos juvenis, embora ainda relativamente alta em comparação com outros hilídeos (Hillman et al., 2009).

Anuros são capazes de absorver água rapidamente através da superfície ventral, especialmente pela mancha pélvica (McClanahan e Baldwin, 1969; Roth, 1973; Drewes et al., 1977). De maneira geral, as taxas de reabsorção de água através do tegumento são maiores em espécies terrestres e susceptíveis à desidratação do que em espécies aquáticas (Mullen e Alvarado, 1976; Shoemaker e Nagy, 1977). Altas taxas de reabsorção de água são especialmente importantes em ambientes nos quais a disponibilidade de água seja baixa e/ou efêmera (Wells, 2007). No caso de *B. alvarengai*, alta capacidade de absorver grandes volumes de água rapidamente poderia ser crucial para uma adequada manutenção hídrica face a biologia termal peculiar desta espécie, sobretudo devido ao hábito de assoalhar em locais distantes de água livre. De fato, *B. alvarengai* apresenta taxas de absorção a partir de água livre cerca de 40 vezes superiores às taxas de PEA indicando elevada capacidade de absorver água, possibilitada principalmente pela mancha pélvica extremamente bem desenvolvida na espécie (ver capítulo 4). Isto parece ser especialmente relevante considerando as características dos campos rupestres já que permitiria, por exemplo, o aproveitamento do orvalho nas primeiras horas da manhã (ver Dole, 1967).

Anfíbios são bem conhecidos por armazenarem água na bexiga urinária e por sua capacidade de mobilização desta água para a manutenção do balanço hídrico (Ruibal, 1962; McClanahan, 1967; Pough et al., 1983; Sinsch, 1991). O volume de água armazenada neste órgão pode, em anuros de uma maneira geral, ser considerado relativamente alto em comparação com outros vertebrados (Wells, 2007; Hillman et al., 2009). Além disso, a

capacidade de armazenamento de água na bexiga dos anuros também encontra-se relacionada com o hábito dos animais, com espécies terrestres e arbóreas exibindo volumes maiores do que espécies aquáticas (Jorgensen, 1997; Wells, 2007; Hillman et al., 2009). Não raro, o volume de urina armazenado por anuros chega a valores acima de 30% da massa corpórea e, em um caso extremo, *Cyclorana platycephala*, o volume de urina recuperado foi superior à própria massa corpórea do animal (= 130% da massa corpórea) (Van Beurden, 1984; Jorgensen, 1997).

O volume de urina armazenada na bexiga urinária de *B. alvarengai* pode ser considerado relativamente baixo em comparação com outros anuros, porém, a validade desta conclusão é questionável, pois a determinação do volume carece de uma padronização metodológica que permita a comparação entre diferentes estudos (Jorgensen, 1997; Hillman et al., 2009). De fato, mais do que tentar determinar a capacidade máxima da bexiga urinária de *B. alvarengai*, nós tentamos determinar o volume médio mantido em uma situação rotineira por exemplares bem hidratados, empregando o método descrito por Ruibal (1962) e Claussen (1974). Mesmo considerando-se o volume médio de urina expelida pelos indivíduos em situação não controlada (o qual foi compatível com o volume fornecido pelos animais experimentais), acreditamos que o volume encontrado para *B. alvarengai* não seja comparável com o volume máximo registrado em outros anuros já que nossos resultados fornecem um indicativo da quantidade de urina usualmente armazenada na bexiga. Todavia, analisando-se a ecologia de *B. alvarengai* e as características dos campos rupestres, uma elevada capacidade de armazenamento de água na bexiga urinária parece não ser fundamental neste caso. Apesar das restrições hídricas do ambiente, o armazenamento de água em forma de urina poderia ser necessário apenas para suprir as necessidades dos animais por um curto período de tempo (de um dia para outro), já que mesmo longe de corpos d'água os animais têm acesso à água livre em forma de orvalho, podendo ainda, reabsorver a água perdida durante o assoalhamento através de mecanismo de condensação.

De modo geral, neste capítulo investigamos as inter-relações entre a ecologia termal e a manutenção do balanço hídrico em *B. alvarengai* procurando entender as implicações e consequências do modo de vida e ambiente particulares da espécie. Frente aos elementos abióticos desafiadores do meio no qual é encontrada, como as oscilações de temperatura e forte sazonalidade na disponibilidade dos recursos hídricos, o assoalhamento ao mesmo tempo que se comporta como relevante para o controle da temperatura corpórea, configura um comportamento custoso para a espécie em termos de regulação hídrica. Sendo assim, a evolução de adaptações que possibilitam o assoalhamento neste caso são essenciais de modo que os benefícios sobrepujem os custos. De fato, *B. alvarengai* apresenta ajustes comportamentais,

morfológicos e fisiológicos que dão suporte ao comportamento de assoalhar, evidenciando uma complexa interação animal-ambiente. Este conjunto de características adaptativas envolvem um delicado balanço entre termorregulação, equilíbrio hídrico e outros aspectos ecologicamente relevantes e parecem constituir, efetivamente, o principal agente no sucesso da espécie nos campos rupestres.

REFERÊNCIAS

- Bakken, G.S. & Gates, D.M. (1975). Heat transfer analysis of animals: some implications for field ecology, physiology, and evolution. In: Gates, D.M. & Schmerl, R.B. (Ed.). Perspectives in Biophysical Ecology, pp.255–290. New York: Springer.
- Bakken, G.S. (1992). Measurement and application of operative and standard operative temperatures in ecology. *Am Zool* 32(2):194–216.
- Barbeau, T.R. & Lillywhite, H.B. (2005). Body wiping behaviors associated with cutaneous lipids in hylid tree frogs of Florida. *Journal of Experimental Biology* 208, 2147–2156.
- Bartelt, P.E. & Peterson, C. R. (2005). Physically modeling operative temperatures and evaporation rates in amphibians. *Journal of Thermal Biology*, 30(2):93–102.
- Bates, D., Maechler, M. & Bolker, B. (2013). lme4: Linear Mixed-Effects Models using Eigen and Variance Components. R package version 0.999999-1.3, URL <http://CRAN.R-project.org/package=lme4>.
- Berger, L., Speare, R., Daszak, P., Green, D.E., Cunningham, A.A., Goggin, C.L., Slocombe, R., Ragan, M.A., Hyatt, A.D., McDonald, K.R., Hines, H.B., Lips, K.R., Marantelli, G. & Parkes, H. (1998). Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(15):9031–36.
- Blaylock, L.A., Ruibal, R., Plattaloia, K. (1976). Skin structure and wiping behavior of phyllomedusine frogs. *Copeia* 283–295.
- Blouin-Demers, G., Weatherhead, P.J. (2001). An experimental test of link between foraging, habitat selection and thermoregulation in black rat snakes *Elaphe obsoleta obsoleta*. *Journal of Animal Ecology* 70: 1006–1013.
- Bokermann, W.C.A. (1964). Dos novas espécies de *Hyla* de Minas Gerais y notas sobre *Hyla alvarengai* Bok. (Amphibia, Salientia-Hylidae). *Neotropica* 10:67–76.
- Bosch, J., Martínez-Solano, I., García-Paris, M. (2001). Evidence of a chytrid fungus infection involved in the decline of the common midwife toad (*Alytes obstetricans*) in protected areas of central Spain. *Biological Conservation* 97(3):331–37.

- Brattstrom, B.H. (1963). A preliminary review of the thermal requirements of amphibians. *Ecology* 44:238–55.
- Brattstrom, B.H. (1968). Thermal acclimation in anuran amphibians as a function of latitude and altitude. *Comparative Biochemistry and Physiology* 24(1):93–111.
- Brattstrom, B.H. (1979). Amphibian temperature regulation studies in the field and laboratory. *American Zoologist*, 19(1):345–56.
- Cagle, F.R. 1950. The life history of the slider turtle, *Pseudemys scripta troostii* (Holbrook). *Ecological Monographs*, 20(1):31–54.
- Campbell, G.S. 1977. An introduction to environmental biophysics. Springer, Berlin Heidelberg, New York.
- Casterlin, M.E. & Reynolds, W.W. (1977). Behavioral fever in anuran amphibian larvae. *Life sciences*, 20(4):593–96.
- Christian, K.A., Nunez, F., Clos, L., & Diaz, L. (1988). Thermal relations of some tropical frogs along an altitudinal gradient. *Biotropica*, 236–239.
- Claussen, D.L. (1974). Urinary bladder water reserves in the terrestrial toad, *Bufo fowleri*, and the aquatic frog, *Rana clamitans*. *Herpetologica* 30(4):360–367.
- Daszak, P., Cunningham, A.A. & Hyatt, A.D. (2003). Infectious disease and amphibian population declines. *Diversity and Distributions*. 9:141–50.
- Dole, J.W. (1967). The role of substrate moisture and dew in the water economy of leopard frog, *Rana pipiens*. *Copeia* 1967:141–149.
- Drewes, R.C., Hillman, S.S., Putnam, R.W. & Sokol, O.M. (1977). Water, nitrogen and ion balance in the African treefrog *Chiromantis petersi* (Rhacophoridae); structure of the integument. *Journal of Comparative Physiology B* 116: 257–267.
- Dzialowski, E.M. (2005). Use of operative temperature and standard operative temperature models in thermal biology. *Journal of Thermal Biology*, 30(4):317–334.
- Eiten, G. (1978). Delimitation of Cerrado concept. *Vegetatio* 36:169–178.
- Eterovick, P.A & Sazima, I. (2004). Anfíbios da Serra do Cipó, Minas Gerais – Brasil. Belo Horizonte: PUC Minas.
- Freed, A.N. (1980). An adaptive advantage of basking behavior in an anuran amphibian. *Physiological Zoology* 53:433–44.
- Furley, P.A. (1999). The nature and diversity of neotropical savanna vegetation with particular reference to the Brazilian cerrados. *Global Ecol Biogeogr* 8:223–241.

Gewin, V. (2008). Riders of a modern-day ark. *PLoS Biology*, 6(1):e24.

Giulietti, A.M., Menezes, N.L., Pirani, J.R., Meguro, M. & Wanderley, M.G.L. (1987). Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Caracterização e lista de espécies. *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo* 9:1–152.

Giulietti, A.M. & Pirani, J.R. (1988). Patterns of geographic distribution of some plant species from the Espinhaço Range, Minas Gerais and Bahia, Brazil. In: Heyer, W.R. & Vanzolini, P.E. (Ed.). *Proceedings of a workshop on Neotropical Distribution Patterns*, pp.39–69. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências.

Giulietti, A.M., Pirani, J.R. & Harley, R.M. (1997) Espinhaço Range region, eastern Brazil. In: Davis, S.D., Heywood, V.H., Herrera-MacBryde, O., Villa-Lobos, J. & Hamilton, A.C. (Ed.). *Centres of plant diversity: a guide and strategy for their conservation*, 3. Oxford: Information Press.

Greenwald O.E. & Kanter, M.E. (1979). The effects of temperature and behavioral thermoregulation on digestive efficiency and rate in corn snakes (*Elaphe guttata guttata*). *Physiological Zoology*, 52:398–408.

Gründler, M.C., Toledo, L.F., Parra-Olea, G., Haddad, C.F.B., Giasson, L.O.M., Sawaya, R.J, Prado, C.P.A., Araujo, O.G.S., Zara, F.J., Centeno, F.C. & Zamudio, K.R. (2012). Interaction between breeding habitat and elevation affects prevalence but not infection load of *Batrachochytrium dendrobatidis* in anuran assemblages. *Diseases and Aquatic Organisms* 97:173–184.

Heyer, W.R. (1999). A new genus and species of frog from Bahia, Brazil (Amphibia: Anura: Leptodactylidae) with comments on the zoogeography of the Brazilian campos rupestres. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 112(1):19–39.

Hillman, S.S., Withers, P.C., Drewes, R.C. & Hillyard, S.D. (2009). *Ecological and environmental physiology of amphibians*. New York: Oxford University Press.

Hutchison, V.H. & Dupré, R.K. (1992). Thermoregulation. In: Feder, M.E. & Burggren, W.W. (Ed.). *Environmental Physiology of the Amphibians*, pp. 206–249. Chicago: The University of Chicago Press.

Jameson, D.L. (1966). Rate of weight loss of tree frogs at various temperatures and humidities. *Ecology* 47(4):605–613.

Jared, C., Antoniazzi, M.M., Navas, C.A., Katchburian, E., Freymüller, E., Tambourgi, D.V., Rodrigues, M.T. (2005). Head co-ossification, phragmosis and defence in the casque-headed tree frog *Corythomantis greeningi*. *Journal of Zoology* 265:1–8.

Joly, A.B. (1970). *Conheça a Vegetação Brasileira*. São Paulo: Polígono.

- Jorgensen, C.B. (1992). Growth and reproduction. In: Feder, M.E. & Burggren, W.W. (Ed.). *Environmental Physiology of the Amphibians*, pp. 439–66. Illinois: Univ. Chicago Press. Chicago.
- Jorgensen, C.B. (1997). 200 years of amphibian water economy: from Robert Townson to the present. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 72(02):153–237.
- Kaul, R., Shoemaker, V.H. (1989). Control of thermoregulatory evaporation in the waterproof treefrog *Chiromantis xerampelina*. *Journal of Comparative Physiology B*. 158:643–649.
- King, R.B., Hauff, S., Phillips, J.B. (1994). Physiological color change in the green treefrog: responses to background brightness and temperature. *Copeia* 2:422–432.
- Kobelt, F. & Linsenmair, K.E. (1986). Adaptations of the reed frog *Hyperolius viridiflavus* (Amphibia, Anura, Hyperoliidae) to its arid environment. 1. The skin of *Hyperolius viridiflavus nitidulus* in wet and dry season conditions. *Oecologia* 68:533–541.
- Köppen, W. (1900). Versuch einer Klassifikation der Klimate, vorzugsweise nach ihren Beziehungen zur Pflanzenwelt. *Geographische Zeitschrift* 6(11):593–611.
- La Marca, E., Lips, K.R., Lötters, S., Puschendorf, R., Ibañez, R., Rueda-Almonacid, J.V., Schulte, R., Marty, C., Castro, F., Manzanilla-Puppo, J., García-Pérez, J.E., Bolaños, F., Chaves, G., Pounds, J.A., Toral, E. & Young, B.E. (2005). Catastrophic population declines and extinctions in neotropical Harlequin Frogs (Bufonidae: *Atelopus*). *Biotropica* 37:190–201.
- Leite, F.S.F., Juncá, F.A. & Eterovick, P.C. (2008). Status do conhecimento, endemismo e conservação de anfíbios anuros da Cadeia do Espinhaço, Brasil. *Megadiversidade* 4(1–2):182–200.
- Lillywhite, H.B. (1970). Behavioural temperature regulation in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Copeia* 1:158–168.
- Lillywhite, H.B. (1975). Physiological correlates of basking in amphibians. *Comparative Biochemistry and Physiology A*. 52(2):323–330.
- Lillywhite, H.B., Licht, P. & Chelgren, P. (1973). The role of behavioral thermoregulation in the growth energetics of the toad, *Bufo boreas*. *Ecology* 54:375–383.
- Lillywhite, H.B., Mittal, A.K., Garg, T.K. & Agrawal, N. (1997). Wiping behavior and its ecophysiological significance in the Indian Tree Frog *Polypedates maculatus*. *Copeia* 1:88–100.
- Lillywhite, H.B., Mittal, A.K., Garg, T.K. & Das, I. (1998). Basking behavior, sweating and thermal ecology of the Indian tree frog, *Polypedates maculatus*. *Journal of Herpetology* 32(2):169–175.

- Lima, S.S., Marun, B., Alves, P.V. & Bain, O. (2012). *Ochoterenella esslinger* n. sp. (Nematoda: Onchocercidae: Waltonellinae) from *Bokermannohyla luctuosa* (Anura: Hylidae) in Minas Gerais, Brazil, with notes on *Paraochoterenella* Purnomo & Bangs, 1999. *Parasite* 19(4):341–350.
- Lips, K.R., Brem, F., Brenes, R., Reeve, J.D., Alford, R.A., Voyles, J., Carey, C., Livo, L., Pessier, A.P. & Collins, J.C. (2006). Emerging infectious disease and the loss of biodiversity in a Neotropical amphibian community. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:3165–170.
- Longcore, J.E., Pessier, A.P. & Nichols, D.K. (1999). *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia* 91(2):219–227.
- Loveridge, J.P. (1970). Observations on nitrogenous excretion and water relations of *Chiromantis xerampelina* (Amphibia, Anura). *Arnoldia* (Rhodesia) 5:1–6.
- Lutterschmidt, W.I. & Hutchison, V.H. (1997). The critical thermal maximum: data to support the onset of spasms as the definitive end point. *Canadian Journal of Zoology* 75:1553–1560.
- McClanahan Jr, L. (1967). Adaptations of the spadefoot toad, *Scaphiopus couchi*, to desert environments. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 20(1):73–99.
- McClanahan Jr, L. & Baldwin R. (1969). Rate of water uptake through the integument of the desert toad, *Bufo punctatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 28:381–389.
- McClanahan, L.L., Stinner, J.W. & Shoemaker, V.H. (1978). Skin lipids, water loss and energy metabolism in a South American tree frog (*Phyllomedusa sauvagei*). *Physiological Zoology* 51(2):179–187.
- Mullen, T.L. & Alvarado, R.H. (1976). Osmotic and ionic regulation in amphibians. *Physiological Zoology* 49:11–23.
- Navas, C.A. & Araujo, C. (2000). The use of agar models to study amphibian thermal ecology. *Journal of Herpetology* 34(2):330–334.
- Navas, C.A., Antoniazzi, M.M., Carvalho, J.E., Suzuki, H. & Jared, C. (2007). Physiological basis for diurnal activity in dispersing juvenile *Bufo granulosus* in the Caatinga, a Brazilian semi-arid environment. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 147(3):647–657.
- Nave, C.R. (2012). Relative humidity. Available at: <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/kinetic/relhum.html#c4>.
- Pough, F.H., Taigen, T.L., Stewart, M. M. & Brussard, P.F. (1983). Behavioral modification of evaporative water loss by a Puerto Rican frog. *Ecology* 64, 244–252.

R Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.

Rapini, A., Ribeiro, P.L., Lambert, S. & Pirani, J.R. (2008) A flora dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço. *Megadiversidade* 4:15–23.

Richards-Zawacki, C.L. (2010). Thermoregulatory behaviour affects prevalence of chytrid fungal infection in a wild population of Panamanian golden frogs. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 277(1681):519–28.

Riddle, O. (1909). The rate of digestion in cold-blooded vertebrates - the influence of season and temperature. *American Journal of Physiology-Legacy Content* 24(5):447–58.

Rome, L.C., Stevens, E.D., John-Alder, H.B. (1992). The influence of temperature and thermal acclimation on physiological function. In: Feder, M.E. & Burggren, W.W. (Ed.). *Environmental Physiology of the Amphibians*, pp.183–205. Chicago: University of Chicago Press.

Ron, S.R. & Merino, A. (2000). Amphibian declines in Ecuador: overview and first report of chytridiomycosis from South America. *Froglog* 42:2–3.

Roth, J.J. (1973). Vascular supply to the ventral pelvic region of anurans as related to water balance. *Journal of Morphology* 140(4):443–460.

Ruibal, R. (1962). The adaptive value of bladder water in the toad, *Bufo cognatus*. *Physiological Zoology* 35(3):218–223.

Sazima, I. & Bokermann, W.C.A. (1977). Anfíbios da Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil. 3, Observações sobre a biologia de *Hyla alvarengai* Bok. (Anura, Hylidae). *Revista Brasileira de Biologia* 37:413–417.

Schloegel, L.M., Hero, J.M., Berger, L., Speare, R., McDonald, K. & Daszak, P. (2006). The decline of the sharp-snouted day frog (*Taudactylus acutirostris*): the first documented case of extinction by infection in a free-ranging wildlife species? *EcoHealth* 3(1):35–40.

Schmuck, R., Kobelt, F. & Linsenmair, K.E. (1988). Adaptations of the reed frog *Hyperolius viridiflavus* (Amphibia: Anura: Hyperoliidae) to its arid environment: V. Iridophores and nitrogen metabolism. *Journal of Comparative Physiology B* 158:537–546.

Seymour, R.S. (1972). Behavioral thermoregulation by juvenile green toads, *Bufo debilis*. *Copeia* 1972(3):572–5.

Shoemaker, V.H., Balding, D., Ruibal, R. & McClanahan Jr, L.L. (1972). Uricotelism and low evaporative water loss in a South American frog. *Science* 175:1018–1020.

Shoemaker, V.H. & McClanahan, L. (1975). Evaporative water loss, nitrogen excretion and osmoregulation in phyllomedusine frogs. *Journal of Comparative Physiology* 100(4):331–345

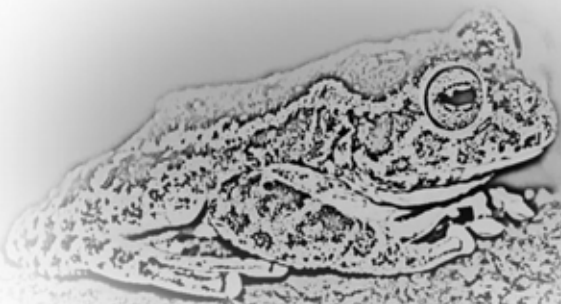
- Shoemaker, V.H. & Nagy, K.A. (1977). Osmoregulation in amphibians and reptiles. *Annual Review of Physiology* 39:449–471.
- Shoemaker, V.H., Hillman, S.S., Hillyard, S.D., Jackson, D.C., McClanahan, L.L., Withers, P.C. & Wygoda, M.L. (1992). Exchange of water, ions, and respiratory gases in terrestrial amphibians. In: Feder, M.E. & Burggren, W.W. (Ed.). *Environmental Physiology of the Amphibians*, pp. 125–150. Chicago: The University of Chicago Press.
- Sievert, L.M. & Andreadis, P. (1999). Specific dynamic action and postprandial thermophily in juvenile northern water snakes, *Nerodia sipedon*. *Journal of Thermal Biology* 24:51–55.
- Sinsch, U. (1991). Reabsorption of water and electrolytes in the urinary bladder of intact frogs (Genus *Rana*). *Comparative Biochemistry and Physiology A* 99:559–565.
- Skerratt, L.F., Berger, L., Speare, R., Cashins, S., McDonald, K.R., Phillott, A.D., Hines, H.B. & Kenyon, N. (2007). Spread of chytridiomycosis has caused the rapid global decline and extinction of frogs. *EcoHealth* 4:125–34.
- Snyder, G.K. & Hammerson, G.A. (1993). Interrelationships between water economy and thermoregulation in the canyon tree frog *Hyla arenicolor*. *Journal of Thermal Biology* 25:321–329.
- Spotila, J.R. & Berman, E.N. (1976). Determination of skin resistance and the role of the skin in controlling water loss in amphibians and reptiles. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 55:407–411.
- Spotila, J.R., O'Connor, M.P. & Bakken, G.S. (1992). Biophysics of heat and mass transfer. In: Feder, M.E. & Burggren, W.W. (Ed.). *Environmental Physiology of the Amphibians*, pp. 59–80. Chicago: The University of Chicago Press.
- Stegen, J.C., Gienger, C.M. & Sun, L. (2004). The control of color change in the Pacific tree frog, *Hyla regilla*. *Canadian Journal of Zoology* 82:889–896.
- Tattersall, G.J., Eterovick, P.C. & Andrade, D.V. (2006). Tribute to R. G. Boutilier: Skin colour and body temperature changes in basking *Bokermannohyla alvarengai* (Bokermann 1956). *Journal of Experimental Biology* 209:1185–1196.
- Tracy, C.R. (1976). A model of the dynamic exchanges of water and energy between a terrestrial amphibian and its environment. *Ecological Monographs* 46:293–326.
- Tracy, C.R., Betts, G., Richard Tracy, C. & Christian, K.A. (2007). Plaster models to measure operative temperature and evaporative water loss of amphibians. *Journal of Herpetology*, 41(4):597–603.
- Van Beurden, E.K. (1984). Survival strategies of the Australian water-holding frog, *Cyclorana platycephalus*. *Arid Australia* 223–234.

- Vasconcelos, M.F., Lopes, L.E., Machado, C.G., Bornschein, M.R. & Rodrigues, M. (2008). As aves dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço: diversidade, endemismo e conservação. *Megadiversidade* 4(1–2):197–217.
- Waldman, B., van de Wolfshaar, K.E., Klena, J.D., Andjic, V., Bishop, P.J. & Norman, R.J.B. (2001). Chytridiomycosis in New Zealand frogs. *Surveillance* 28:9–11.
- Weldon, C. & du Preez, L.H. (2004). Decline of the Kihansi Spray Toad, from the Udzungwa Mountains, Tanzania. *Froglog* 62:2–3.
- Wells, K.D. (2007). The ecology and behavior of amphibians. University of Chicago Press.
- Withers, P.C. (1995). Evaporative water loss and colour change in the Australian desert tree frog *Litoria rubella* (Amphibia: Hylidae). *Records of the Western Australian Museum* 17:277–281.
- Withers, P.C., Hillman, S.S., Drewes, R.C. & Sokol, O.M. (1982). Water loss and nitrogen excretion in sharp-nosed reed frogs (*Hyperolius nasutus*: Anura, Hyperoliidae). *Journal of Experimental Biology*, 97(1):335–343.
- Wong, M.S. & Bundy, D.A.P. (1985). Population distribution of *Ochoterenella digiticauda* (Nematoda: Onchocercidae) and *Mesocoelium monas* (Digenea: Brachycoeliidae) in naturally infected *Bufo marinus* (Amphibia: Bufonidae) from Jamaica. *Parasitology*, 90(3):457–461.
- Woodhams, D.C., Alford, R.A. & Marantelli, G. (2003). Emerging disease of amphibians cured by elevated body temperature. *Diseases of aquatic organisms* 55:65–7.
- Wygoda, M.L. (1984). Low cutaneous evaporative water loss in arboreal frogs. *Physiological Zoology* 57:329–337.
- Wygoda, M. (1988). Adaptive control of water loss resistance in an arboreal frog. *Herpetologica* 44:251–257.
- Young, B.E., Stuart, S.N., Chanson, J.S., Cox, N.A. & Boucher, T.M. (2004). Disappearing jewels: the status of new world amphibians. Virginia: NatureServe.

CAPÍTULO IV

The skin of anurans and basking behaviour: the case of the treefrog *Bokermannohyla alvarengai* (Bokermann, 1956)

Fernanda C. Centeno, Marta M. Antoniazzi, Denis V. Andrade,
Roberto Kodama and Carlos Jared



The skin of anurans and basking behaviour: the case of the treefrog *Bokermannohyla alvarengai* (Bokermann, 1956)

ABSTRACT. Ability to increase body temperature through basking is severely limited in amphibians because radiation absorbed by the skin tends to increase evaporative water loss, which in turn lowers body temperature. Reflecting such compromise, the few anuran species known to bask often exhibit specialized adaptations to reduce dehydration by the improvement in skin resistance to evaporation. Herein, we provide a detailed morphological examination of the skin of *Bokermannohyla alvarengai*, a treefrog of Southeastern Brazil known to bask regularly motionless in full sunlight for extended periods of time. Our investigation focuses on morphological structures related to the control of body temperature and water balance during basking behaviour, with special reference to the environment occupied by this treefrog. Results revealed that *B. alvarengai* evolved morphofunctional adaptations that enable basking far from water sources under high temperatures and solar radiation loads by a combination of: skin colour change, mucosubstances and lipoid skin secretion, well-developed verrucae hydrophilica in the pelvic region and folds throughout the ventral region, and remarkable hypervascularization. These morphological adaptations, together, allows for the efficient use of basking as a thermoregulatory strategy while minimizing its potential accompanying drawbacks for the maintenance of an adequate water balance.

INTRODUCTION

Temperature and water relations constitute major aspects shaping the life history of amphibians. Indeed, body temperature is perhaps the most important ecophysiological variable affecting the performance of anurans (Angilletta et al., 2002). Also, for terrestrial species, keeping an adequate water balance can be particularly challenging due to the characteristically high water-permeable skin of the group (Shoemaker et al., 1992). Temperature and water balance regulation interfere with each other and the maintenance of an adequate body temperature and hydration level can represent a trade-off between the constraints and benefits of each of these physiological functions. Thus, the ecological and evolutionary success of anuran species that inhabit environments with challenging climatic conditions, in terms of temperature and water, will be accompanied by a diversity of behavioural, physiological, and morphological specializations (Jared et al., 2005).

As any other ectotherm, anurans depend primarily on external heat sources to regulate their body temperature (Cowles, 1940; Bogert, 1949), mainly through behavioural adjustments (Cowles & Bogert, 1944; Brattstrom, 1963; Lillywhite, 1971; Lillywhite et al., 1973; Hutchinson & Maness, 1979; Hillman et al., 2009). Basking is one of the main mechanisms by which most ectothermic organisms increase body temperature, exposing whole or part of the body to direct sunlight (Muths & Corn, 1997). However, basking in amphibians has the important drawback of potentially increase the risk of excessive water loss through evaporation. Reflecting such compromise, few species of anurans are reported to bask and, for those in which it occur, basking is usually accompanied by an improvement in skin resistance to evaporation (Bentley, 1966). Likewise, basking anurans often exhibit physiological colour changes that modulate the amount of absorbed solar energy (Hoppe, 1979; Stegen et al., 2004) and, consequently, affecting body temperature and evaporative water loss.

Anuran skin, therefore, constitute the undisputed main interface where the exchange of heat and water between the animal and the environment is integrated, with functional compromises likely being more prominent in basking species. Under this context, the morphological examination of the skin of basking anurans is likely to reveal structural specializations that may be correlated to their particular life history (Toledo & Jared, 1993). Herein, we approach this idea by providing a detailed morphological examination of the skin of a large South American treefrog endemic of *campos rupestres* (rocky meadows) that inhabits areas above 1000 m (Sazima & Bokermann, 1977; Eterovick & Sazima, 2004) in Southeastern Brazil, *Bokermannohyla alvarengai* (Bokermann 1956). Despite its nocturnal habit, this species is known to bask regularly over rock outcrops, where they can remain motionless for extended periods of time completely exposed to full sunlight and wind (Sazima & Bokermann, 1977). While basking, *B. alvarengai* exhibits a marked change in skin coloration going from a mottled cryptic pattern to a chalky white appearance (Fig. 1a, b), which is known to be involved in the modulation of heat exchange (Tattersall et al., 2006).

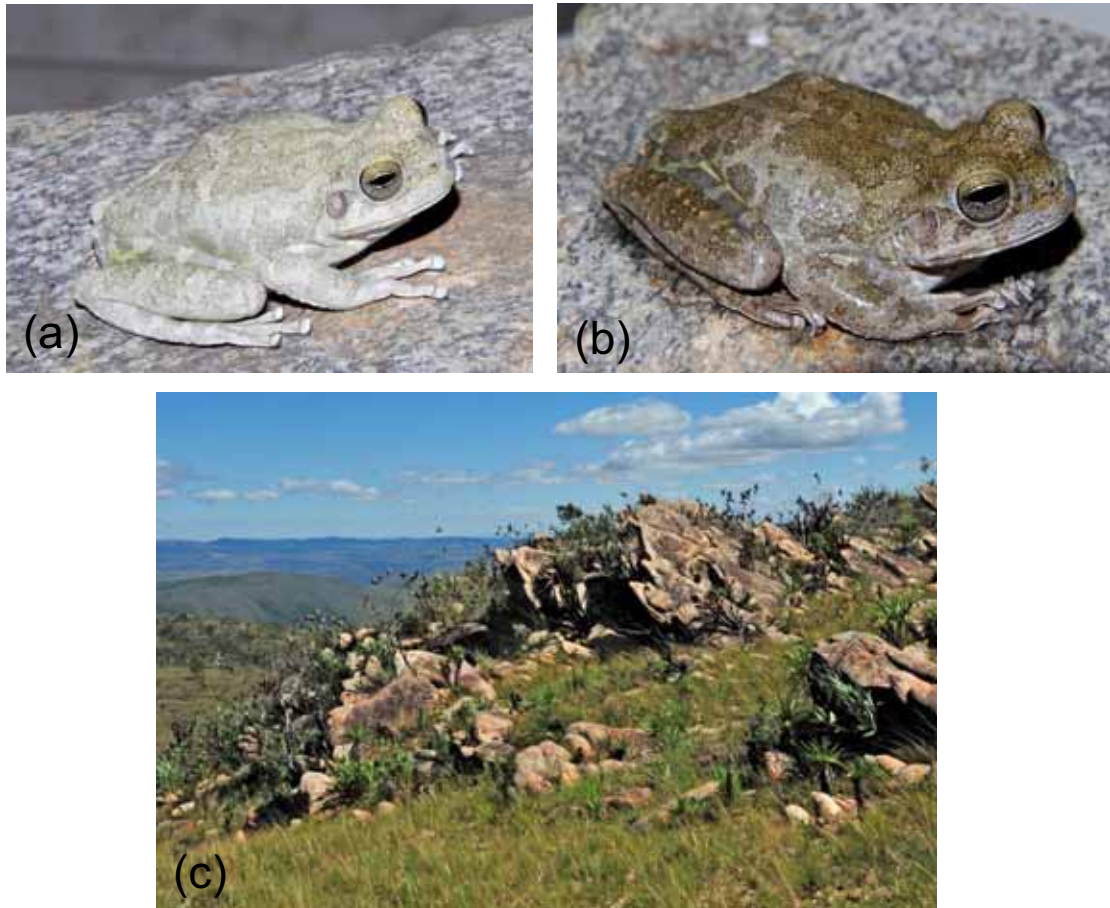


Figure 1. A basking specimen of *Bokermannohyla alvarengai*, showing a bright skin colour (a). The same individual a few minutes after being removed from under the sun, with a dark skin pattern (b). General view of *campos rupestres* at Serra do Cipó (MG, Brazil) where *B. alvarengai* is found (c).

MATERIAL AND METHODS

The habitat

Campos rupestres is a phytophysognomy of the Brazilian Cerrado typically found at elevations above 1000 m, covered predominantly by lowgrowing vegetation with few shrubs and small trees amid rocky outcrops (Fig. 1c). The local climate is the altitudinal tropical with fresh and rainy summers of the type Cwb (following Köppen's classification; Köppen, 1900), and well-established dry season. The high seasonality is marked with rainy periods occurring between October and March, with mean temperature from 12.5 to 29.6°C and 288 mm of mean rainfall, and drier periods between April and September, with mean temperature from 8.6 to 26.8°C and 33 mm of mean rainfall.

Data collection

Six females (SVL = 74.4–86 mm; weight = 31.7–57.4 g) were collected during three

expeditions to the Serra do Cipó (19°12' to 19°20'S; 43°30' to 43°40'W), located at the southern portion of the Espinhaço mountain range, in Minas Gerais state, between November 2011 and July 2012, sampling both rainy and dry periods (SISBIO, 22170-1/2010). Right after collection, before being euthanized, three specimens were left completely exposed to the sunlight for a 10 minutes period (hereafter called bright), and three were held in the full dark for 30 minutes (hereafter called dark); these time periods are known to be long enough for the physiological colour change to occur (see Tattersall et al., 2006). Frogs were then injected with a lethal dose of thiopental (0.03 ml/g) and immediately photographed for colour documentation. Pieces of skin (0.5 x 0.5 cm) were excised from the dorsal, mental, pectoral, ventral, and inguinal regions, and immediately fixed in 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2 (Junqueira, 1995), for light microscopy, and in Karnovsky fixative solution (2.5% glutaraldehyde + 4% paraformaldehyde in sodium cacodilate buffer, 0.1M, pH 7.2) (Karnovsky, 1965), for scanning and transmission electron microscopy (SEM and TEM). The procedures with the bright specimens were conducted in the sunlight, while with the dark specimens a minimum of light was used in order to preserve the skin coloration. After tissue collection the animals were fixed in 10% formalin, and maintained in 70% ethyl alcohol. The specimens were deposited in the Célio F. B. Haddad (CFBH) amphibian collection, Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Campus Rio Claro, São Paulo, Brazil.

Morphological analysis

The integument analyses were conducted at the Laboratório de Biologia Celular of Instituto Butantan. All photomicrographs were obtained with an Olympus BX51 microscope and in an Olympus SZ stereomicroscope equipped with a CCD camera Olympus (Q Color 5) coupled with the software Image-Pro Express (MediaCybernetics).

Light microscopy (LM)

Skin fragments already fixed in paraformaldehyde were dehydrated in crescent ethanol series (70, 95, and 100%), and embedded in glycol metachrylate (Leica historesin), sectioned 1-2 µm thick, and stained with toluidine blue-fuchsin for general observations. Skin fragments also were embedded in paraffin, sectioned 5 µm thick, and stained with hematoxylin-eosin for general morphology, von Kossa for detection of calcium, and Sudan Black B for identification of lipids.

Transmission electron microscopy (TEM)

Skin fragments fixed in Karnovsky solution were post-fixed in 1% osmium tetroxide and pre-contrasted in 0.5% uranyl acetate + 13.3% sucrose. After dehydration in crescent ethanol series, the samples were embedded in epoxy resin (Electron Microscopy Sciences) using flat moulds. Ultrathin sections (60-70 nm) were obtained in a Sorvall MT 6000 ultramicrotome, collected on copper grids, contrasted in aqueous 2% uranyl acetate and lead citrate, and examined in a LEO 906E TEM (Zeiss, Germany). Images were captured by a CCD camera MegaView III, using the software Item - universal TEM Imaging Platform (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Germany).

Scanning electron microscopy (SEM)

The sections fixed in Karnovsky fixative were post-fixed in 1% osmium tetroxide. Cleaning was done in ultrasound at a frequency of 40 Hz in a solution containing sodium alkyl benzene sulfonate (Reckitt Benckiser, Brazil). After washing in distilled water, the samples were dehydrated in crescent ethanol series, dried in critical point drier equipment Leica EM model CPD 030, mounted in aluminium stubs, and covered with gold in sputtering equipment (Leica EM model SCD 050). The samples were then examined in a FEI Quanta 250 SEM.

RESULTS

The skin of *Bokermannohyla alvarengai* shows the typical characteristics of anurans. The total thickness of the skin is $245 \pm 11 \mu\text{m}$ in the dorsal region and $354 \pm 35 \mu\text{m}$ in the ventral region. Both dorsal and ventral skins are composed of an epidermis, a dermis with a *stratum spongiosum* and a *stratum compactum*, and a subcutaneous tissue (Fig. 2a). Interspaced muscle fibers transversely cross the skin connecting the basis of epidermis with the subcutaneous tissue. The epidermis of the dorsum is composed of 6–7 cell layers (Fig. 2b, c), while in the ventral region it is composed of 5–6 layers.

Just below the epidermis, in the dorsal skin, there is a pigment layer composed of a very thin layer of xanthophores on top of a monolayer of quite large iridophores measuring $27 \pm 2 \mu\text{m}$ in the longer axis and $10 \pm 1 \mu\text{m}$ in the shorter axis, and an inferior layer of melanophores, with very prominent cytoplasmic processes embracing the iridophores (Figs. 2b, c). In animals killed while in the darkness, pigments were well dispersed onto the cytoplasmic processes of the melanophores (Fig. 2c) whereas in animals killed while exposed to the sunlight, pigments were concentrated at the nuclear region (Fig. 2b). The prominent pigment layer is typical of the

dorsum, which also shows some melanophores around the glands, near the calcified dermal layer (Figs. 2b, and 3d) and in the subcutaneous tissue (Figs. 2d, and 3e). The ventral skin shows a reduced number of melanophores that are sparsely located within the skin, in equivalent positions to those of the dorsal skin. In the inguinal skin, a few sporadic pigment cells were also found.

Glands are observed bellow the pigment cells and follow the general pattern of other anurans, with one type of granular gland and two types of mucous glands (Fig. 2a, b). The granular glands are usually round or bottle-shaped and are much larger than the mucous glands; they are syncytial and full of spherical eosinophilic granules quite homogeneous in size (Fig. 2b, c), very reactive to bromophenol blue (Fig. 2g) and with a moderate affinity to Sudan Black (Fig. 2e). At the TEM, the granules are quite electrondense (Fig. 3a, b). The mucous glands are acinar and constituted by a simple secretory epithelium and a lumen. One type (m_1) is usually larger, characterized by a wide lumen and a short secretory epithelium constituted by cells of only one type, which are very reactive to PAS and alcian blue (Figs. 2b, f, and 3b). The other type of mucous gland (m_2) is usually smaller, with a narrow lumen and composed by two different types of secretory cells (Fig. 2b), one with apical and small mucous (PAS and alcian blue positive) granules which are moderate electrondense at the TEM (Figs. 2f, g, and 3c), and another type characterized by granules positive to bromophenol blue which are quite electrondense (Figs. 2f, g, and 3c). Blood vessels as well as a number of melanophores without an apparent arrangement are present among the glands. In the dorsal skin, the glands are not uniformly disposed but the granular glands are more aggregated in some regions where they can reach a large (bottle-shaped) size (Fig. 2a).

Just bellow the glands, in the dorsal skin, a continuous calcified dermal layer about $3.8 \pm 0.8 \mu\text{m}$ thick is disposed parallel to the epidermis (Fig. 2b). At the TEM, it is characterized as a heterogeneous aggregation of irregular electrondense vesicles (Fig. 3c, d). It is common the presence of melanophores on top of the calcified dermal layer (Fig. 3d). Although more prominent in the dorsal skin, a discrete non-continuous calcified layer is also observed in the skin of the ventral area, specially at the cranial region and tending to disappear towards the caudal region; it has never been noted in the inguinal region.

Bellow the *stratum spongiosum*, follows the *stratum compactum*, which is basically composed of thick collagen fibres that are arranged in a basket-like interlacing (Fig. 2a). The subcutaneous tissue is composed of loose connective tissue containing blood vessels, nerves, and many large lipid droplets grouped in some regions but absent in others in a discontinuous manner (Fig. 2a, d, e). These lipid droplets are present in great numbers in the dorsal and

pectoral skin and were not seen in the ventral and inguinal regions. When observed at the TEM, the droplets are characterized as typical adipocytes, with a peripheral nucleus and a narrow cytoplasm containing smooth endoplasmic reticulum surrounding a very large spherical lipid inclusion (Fig. 3e, f).

The surface of the skin basically shows the same type of arrangement regardless body region. The outermost epidermal cells are polygonal and strongly connected. The skin microdermatoglyphics reveals a characteristic labyrinthic design. Glandular pores are seen in the intercellular spaces, in round or crow's feet shape (Fig. 4a). The ventral skin is very irregular characterized by a large number of folds in a pattern of elevations and grooves giving to the structure the aspect of "mountains" and "valleys", being the inguinal region densely studded with well-developed *verrucae hydrophilica* (Fig. 4b, d, f). The observation of the surface of the verrucae at the SEM reveals many small pits irregularly dispersed, with diameters around 3.5 μm (Fig. 4c, e).

Besides the presence of verrucae, the inguinal skin shows an external epidermal layer that is not as cornified as in the rest of the body with cells possessing a clear cytoplasm and a more rounded (less flat) shape (Fig. 4g). At the TEM, these cells show moderate electron density and pycnotic nuclei (Fig. 4h). Many other clear cells are observed in the three more external epidermal layers. The vascular system in the inguinal region is very prominent, with thick vessels within the subcutaneous tissue that ramifies towards the surface, giving rise to a large number of capillaries that penetrate deeply (i.e., toward body surface) into the epidermis, in some cases being at only 2–3 cell layers from the surface of the body (Figs. 4f–h).

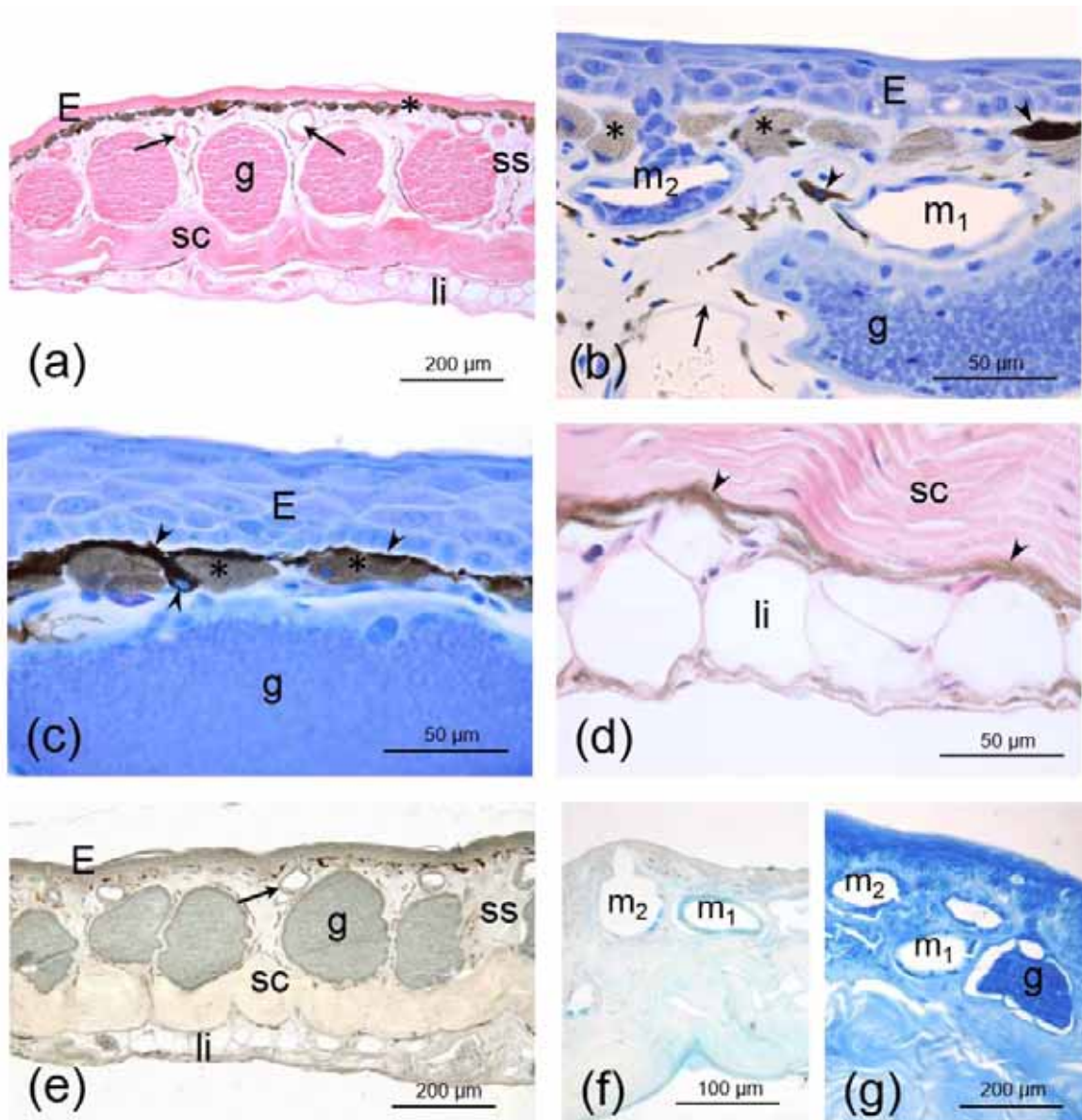


Figure 2. *Bokermannohyla alvarengai*. (a) General view of the dorsal skin. Note the large number of granular glands and the adipocytes in the subcutaneous layer. The arrows point to mucous glands, and iridophores are represented by asterisk (*). Paraffin section, HE staining. (b) Detail of the dorsal skin of an individual killed while exposed in the light. The iridophores (*) are totally exposed to the light due to the concentration of the pigments at the nuclear region of the melanophore (arrowheads). The arrow points to the calcified dermal layer. Histoiresin section, toluidine-fuchsin staining. (c) Detail of the dorsal skin of an individual killed while in the dark. The iridophores (*) are hidden by the dispersal of the pigments on the melanophore cytoplasmic processes (arrowheads). Histoiresin section, toluidine-fuchsin staining. (d) Detail of the dorsal skin showing the subcutaneous tissue full of adipocytes, and the presence of melanophores (arrowheads). Paraffin section, HE staining. (e) General view of the dorsal skin in a section equivalent of figure 2a, showing a moderate affinity of the granular glands to sudan black staining. The arrow points to mucous gland. Paraffin section, sudan black histochemistry method. (f) Pectoral skin, focusing the two types of mucous glands after being submitted to alcian blue, pH 2.5. Paraffin section, alcian blue, pH 2.5 histochemistry method. (g) Pectoral skin, focusing the two types of mucous glands and a granular gland after being submitted to bromophenol blue reaction. Paraffin section, bromophenol blue histochemistry method. E, epidermis; g, granular gland; li, adipocytes; m₁, mucous gland type 1; m₂, mucous gland type 2; sc, *stratum compactum*; ss, *stratum spongiosum*.

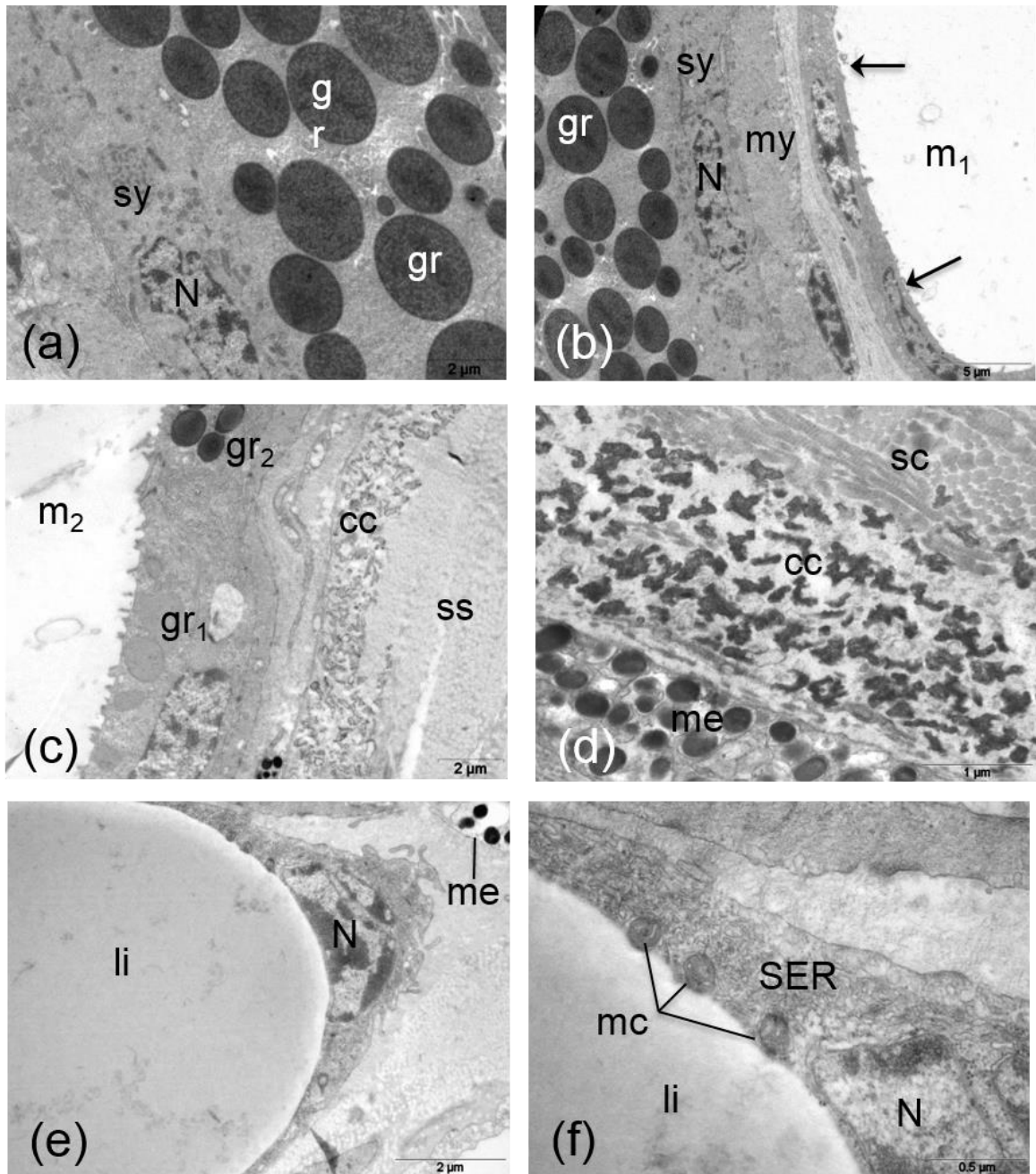


Figure 3. *Bokermannohyla alvarengai*. Transmission electron microscopy (TEM) of the skin. (a) Detail of part of a syncytial granular gland, characterized by the perypheral cytoplasm with nuclei, and the internal spherical and electrondense granules. (b) Part of a granular gland and of a mucous gland type 1, with a very flat secretory epithelium (arrows). (c) Part of a mucous gland type 2, showing the two types of cell composing the secretory epithelium with granules with different electrondensities (gr_1 and gr_2). (d) Calcified dermal layer presented mainly in the dorsal skin, between the *stratum spongiosum* and the *stratum compactum*. (e) Part of an adipocyte in the subcutaneous layer, containing a very large lipid inclusion. (f) Detail of the image in Fig. 3e, showing the adipocyte cytoplasm, rich in smooth endoplasmic reticulum. cc, calcified dermal layer; li, lipid inclusion; gr, electrondense granules; m, mitochondria; me, melanophore; my, myoepithelial layer; m_1 , mucous gland type 1; m_2 , mucous gland type 2; N, nucleus; SER, smooth endoplasmic reticulum; ss, *stratum spongiosum*; sy, perypheral cytoplasm.

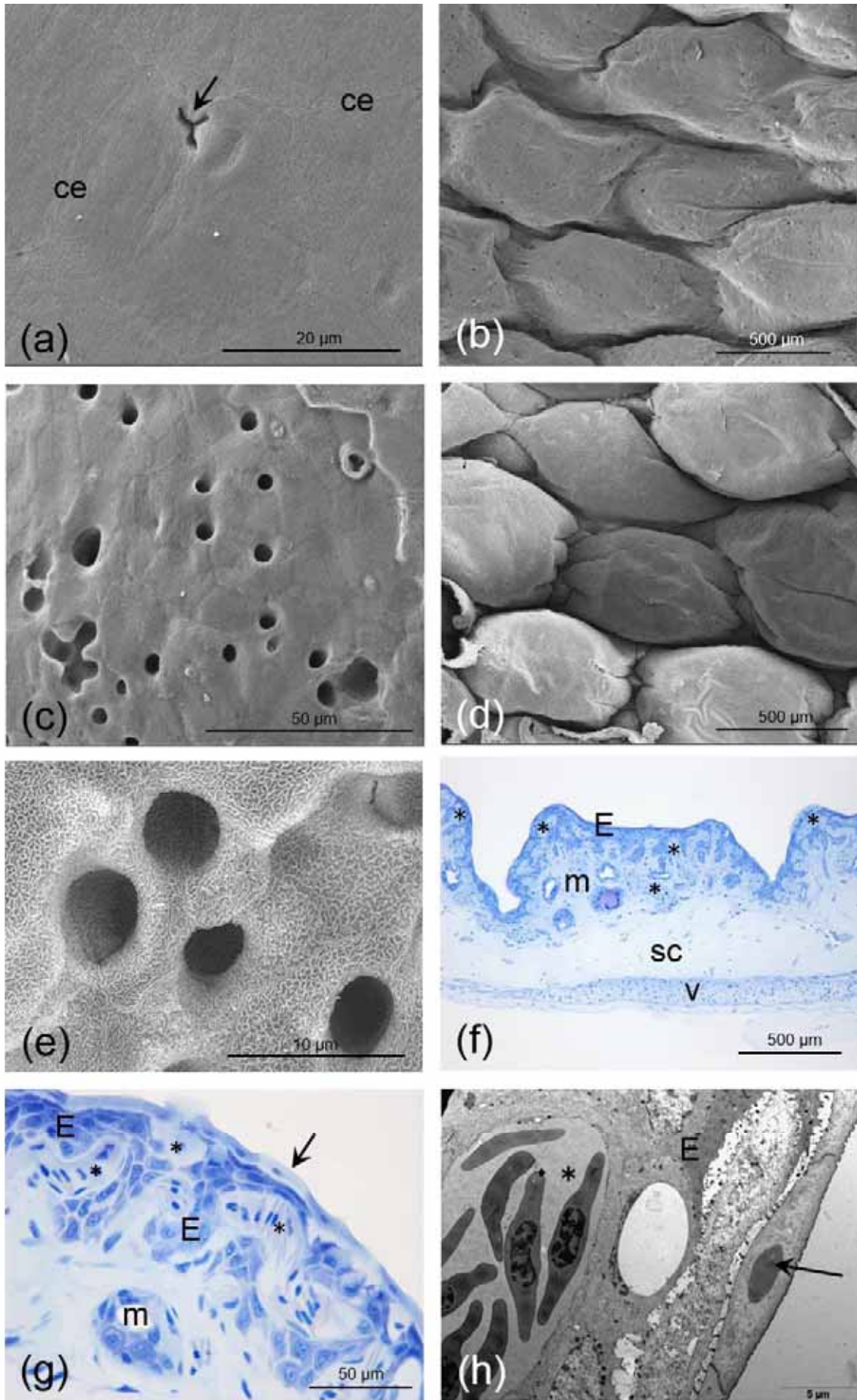


Figure 4. *Bokermannohyla alvarengai*. (a) Surface of the dorsal skin showing the typical labyrinthic design of the polygonal epidermal cells. The arrow points to a glandular pore. SEM. (b) Verrucae hydrophilica in the pectoral region. SEM. (c) Detail of a verruca in the pectoral region showing the surface of the epidermal cells full of small tips. SEM. (d) Verrucae in the inguinal region. SEM. (e) Detail of the tips in a verruca of the inguinal region. SEM. (f) General aspect of the verrucae in the inguinal region. Note the large number of blood vessels coming from the subcutaneous tissue and giving rise to capillaries (*) that penetrate the epidermis. Historesin section, toluidine-fuchsin staining. (g) Detail of the capillaries (*) penetrating the epidermis. Note the clear cells (arrow) covering the surface of the skin. Historesin section, toluidine-fuchsin staining. (h) A detailed view of a capillary (*) getting very close to the epidermis surface of the inguinal skin. Note the clear cell forming the external layer, with a pycnotic nucleus (arrow). TEM. ce, cellular limits; E, epidermis; m, mucous glands; sc, *stratum compactum*. v, blood vessels.

DISCUSSION

The highly permeable skin of anurans generally limits their ability to use basking as a means of increasing body temperature since the sun exposition is usually followed by increased rates of evaporative water loss (Jameson, 1966; Shoemaker et al., 1992). Some species, however, appear to circumvent this problem behaviourally by basking near or into shallow water bodies, which allows for an easy shuttling between sunlight exposure to more amenable conditions (Brattstrom, 1963; Lillywhite, 1970; Tracy et al., 1973). However, a few anuran species can remain stationary and exposed to direct solar radiation for prolonged periods away from water sources without compromising their water balance (Lillywhite, 1970). This is certainly the case of *Bokermannohyla alvarengai*, for which our detailed morphological examination allowed for the following discussion, focused on how the constraints and benefits associated to body temperature and water balance regulation are integrated into particular structural modifications found in the skin of this basking treefrog.

Basking anurans exhibit a suite of behavioural, physiological, and morphological specializations allowing for the use of a thermoregulatory strategy usually unapproachable for the vast majority of amphibians. Among them, physiological colour change, as exhibited by *B. alvarengai*, is known to modulate heat absorption (see also Tattersall et al., 2006). Herein, we found that such capacity is given by the organization of chromatophores in the dermis of the dorsal skin associated to the dispersal/aggregation response of the pigmentary organelles, as previously found in other basking anurans (e.g. Kobelt & Linsenmair, 1986; King et al., 1994; Withers, 1995). Ordinarily, a dermal chromatophore unit consists of a central iridophore capped by a xanthophore, and underlain by a large melanophore that contains finger-like structures or dendrites that extend between the iridophores and xanthophores (Bagnara et al., 1968). The

iridophores are responsible for imparting pale coloration through the light-reflecting organelles, mainly stacks of purine-containing reflecting platelets, while the melanophores play a role in darkening the animal through melanin rearrangement within the cytoplasm (see Bagnara et al., 1968). Basically, to a dark-coloured skin, melanosomes migrate from the basal position to the cellular processes involving the iridophores and, therefore, obscuring the reflecting capability of the brightly coloured pigments within them. On the contrary, during basking melanosomes are concentrated around the cell body underneath the iridophores allowing for light to be reflected by the crystals within the iridophore causing the whitening of the skin. These responses were clearly apparent on the skin of sun and dark exposed *B. alvarengai* (see Figure 2b, c) providing the structural basis underlying the dramatic ability of this species to alter its skin colouration. Indeed, we found that the iridophores on the skin of *B. alvarengai* are very prominent and numerous in the dorsal region forming a dense layer of purine with a palisade like appearance unique to this species. Such an arrangement is thought to potentiate cutaneous reflectance, which in turn will render the physiological colour change even more efficient in terms of modulating heat absorption/reflection. The number of pigment cells per chromatophore unit is variable among anuran species (cf. Bagnara et al., 1968), but independent of their conformation, the ability of iridophores to reflect light is well known in providing an excellent basis for use in temperature regulation (Withers et al. 1982; Kobelt & Linsenmair 1986; Schmuck et al., 1988).

Despite the fact that *B. alvarengai* is not considered a ‘waterproof’ species (cf. Tattersall et al., 2006), it presents low rates of evaporative water loss (EWL) compared to other non-basking hylid frogs (e.g. Wygoda, 1984) (see chapter 3), suggesting the existence of mechanisms to minimize water loss through evaporation. On this regard, the identification in the present work of both mucosubstances and the lipid secretion on the skin of *B. alvarengai* is thought to assist in the prevention of excessive EWL through the formation of an extra-epidermal layer. This could also explain why basking individuals observed in the field often seem to be coated with a pale moist secretion (personal observation). Finally, biochemical analysis of the skin secretion clearly shows the existence of different lipid compounds that can exert influence on thermoregulation and water balance.

Many other frogs are known to change the permeability of skin by secreting a lipid coating on the body surface. However, the nature and the origin of the lipid secretion may differ considerably among different species. As observed in *B. alvarengai*, the lipid secretion in some non-waterproof species of the genus *Hyla* occurs only via granular glands (Barbeau & Lillywhite, 2005), while in *Polypedates maculatus* only the mucous glands secrete lipid

(Lillywhite et al., 1997). Amongst waterproof frogs, in the genus *Phyllomedusa*, a specialized type of gland spread throughout the skin is dedicated to lipid production (Blaylock et al., 1976; McClanahan et al., 1978), whereas in *Litoria caerulea* the lipid is produced both in specialized glands and within the mucous glands (Christian et al., 1988; Christian & Parry, 1997). It therefore appears that the capability of secreting lipids is not confined to a single dermal gland type, and a few different glands may be involved in the process (see also Warburg et al., 2000). Independent of the secretion pathway, the presence of extra-epidermal lipids appear to be a convergent adaptive response found among several distantly related genera of arboreal frogs inhabiting arid or seasonally arid environments (Barbeau & Lillywhite, 2005), as the case of *B. alvarengai*.

In addition to extra-epidermal lipid substance, *B. alvarengai* shows many large adipocytes grouped in some parts of the subcutaneous layer of the dorsal and pectoral skin. These cutaneous droplets of lipid have been suggested to be important for protecting frogs from desiccation since skin permeability to water is influenced by lipid content (Schmid & Barden, 1965; Toledo & Jared, 1993). In fact, some waterproof species appear to use an unbroken layer of cutaneous lipids as a waterproofing mechanism (e.g. Amey & Grigg, 1995). On the other hand, the role of a discontinuous layer of adipocytes, as observed in *B. alvarengai* (present study) and other non-waterproof species (see Wygoda et al., 1987), is less clear as it has been suggested to be linked to energy storage. Presently, we cannot disentangle the relative contribution of a discontinuous lipid layer for the proposed roles, however, as both functions are not exclusionary to each other, it might be the case that both are at play in *B. alvarengai*, even though with a lesser contribution to skin resistance in comparison to species possessing a continuous layer.

As observed in other anuran species (see Drewes et al., 1977), *B. alvarengai* presents well-developed verrucae hydrophilica in the pelvic region and a large number of folds throughout the mental and pectoral region, making the entire ventral surface essentially roughened. As a result, surface area is substantially increased at these regions, which combined with the thinning of the epidermal barrier, also typical of the verrucae, undoubtedly facilitate rapid water uptake by osmotic water absorption (McClanahan & Baldwin, 1969; Baldwin, 1974; Roth, 1973; Toledo & Jared, 1993; Hillyard et al., 1998; Wells, 2007). The presence of the small pits dispersed on the verrucae surface of *B. alvarengai* has its role yet to be determined, but its location on the verrucae indicate that they are likely associated to water absorption. These morphological structures were never been identified before and its anatomical details and putative role clearly deserves further investigation.

We observed a remarkable hypervascularization in *B. alvarengai*, essentially in the pelvic skin, which may be related to the need of distributing the water being absorbed at this region to the other parts of the body (see McClanahan & Baldwin, 1969; Roth, 1973; Drewes et al., 1977; Navas et al., 2004). Vascularization is an essential characteristic of the dermis with capillaries rarely penetrating onto the epidermis (Lillywhite & Maderson, 1988). However, the skin vasculature of *B. alvarengai* reaches the outermost layer revealing an extraordinary rich network of capillaries that pervades the epidermis and almost reach the skin surface. As this feature is particularly distinctive in the pelvic region, in close association with the verrucae, its functional relevance for water reabsorption seems to be corroborated.

The calcified dermal layer in anurans has being suggested to play a role in water conservation by reducing evaporative water loss when present (cf. Toledo & Jared, 1993). In the particular case of *B. alvarengai*, the continuous calcified layer observed in the dorsum could be interpreted as important to prevent excessive EWL through this region that usually is exposed, particularly during basking. On the other hand, the discrete non-continuous layer in the ventral face and the total absence in the inguinal region might be thought as convenient for water absorption. However, the fact that the calcified layer lies deep into the vascular plexus of the *stratum spongiosum* gives it a singularly poor position for assisting in water conservation (Drewes et al., 1977). Additionally, we have observed that *B. alvarengai* has a thinner calcified dermal layer in comparison to the gladiator smith frog *Hypsiboas faber*, a species dwelling in mesic habitats (personal observation). Therefore, the relationship between the calcified dermal layer and evaporative water loss in anurans may be confounded by other putative, non-exclusionary roles associated to it, for example, as a calcium reservoir (cf. Toledo & Jared, 1993b).

Basking, although relatively uncommon in anurans, is largely assumed to result in a number of thermoregulatory benefits (see Brattstrom 1979). This might be particularly true for animals thriving in areas of moderate to high altitude, where a decrease in the average ambient temperature is accompanied by high levels of solar radiation, such as at *campos rupestres* where *B. alvarengai* is found. Under such situation, the trade-off between thermo and osmoregulation, which is undeniably relevant for amphibians, may favour the appearance of the basking behaviour and, indeed, basking is more commonly found in species occurring at relatively high altitude (cf. Vences et al., 2002). Obviously, accompanying behavioural and physiological responses come into play in order to accommodate heat acquisition through basking without compromising water balance including, for example, the adoption of water conserving posture, the increase in skin resistance to water loss, and the physiological change in skin colouration.

The study of the structural basis underlying these responses in *B. alvarengai* revealed morphological and anatomical features likely representing a convergent adaptation among basking species. Nevertheless, the exact role of such features in water balance and heat exchange remain disputable, as well as the role of the unique structures here described still remains to be determined. It is clear, however, the need for further studies about the morphofunctional integration taking place at anuran skin under different physical stressors imposed by different habitats and life histories.

Acknowledgements. We thank ICMBio for the collecting permit (SISBIO, 22170-1/2010), and Parque Nacional da Serra do Cipó (PNSC) for research assistance. Financial support was provided by FAPESP (grants 2009/15712-0; 2010/05473-6).

REFERENCES

- Amey, A.P. & Grigg, G.C. (1995). Lipid-reduced evaporative water loss in two arboreal hylid frogs. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 111:283–291.
- Angilletta, M.J., Niewiarowski, P.H. & Navas, C.A. (2002). The evolution of thermal physiology in ectotherms. *Journal of Thermal Biology* 27:249–268.
- Bagnara, J., Taylor, J. & Hadley, M. (1968). The dermal chromatophore unit. *Journal of Cell Biology* 38:67–79.
- Baldwin, R.A. (1974). The water balance response of the pelvic “patch” of *Bufo punctatus* and *Bufo boreas*. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 47:1285–1295.
- Barbeau, T.R. & Lillywhite, H.B. (2005). Body wiping behaviors associated with cutaneous lipids in hylid tree frogs of Florida. *Journal of Experimental Biology* 208:2147–2156.
- Bentley, P.J. (1966). Adaptations of Amphibia to arid environments. *Science* 152:619–623.
- Blaylock, L.A., Ruibal, R. & Plattaloia, K. (1976). Skin structure and wiping behavior of phyllomedusine frogs. *Copeia* 283–295.
- Bogert, C.M. (1949). Thermoregulation in reptiles, a factor in evolution. *Evolution* 3:195–211.
- Brattstrom, B.H. (1963). A preliminary review of the thermal requirements of amphibians. *Ecology* 44:238–55.
- Brattstrom, B.H. (1979). Amphibian temperature regulation studies in the field and laboratory. *American Zoologist* 19(1):345–56.

Christian, K., Parry, D. & Green, B. (1988). Water loss and an extraepidermal lipid barrier in the Australian tree frog *Litoria caerulea*. *American Zoologist* 28(4):17A.

Christian, K. & Parry, D. (1997). Reduced rates of water loss and chemical properties of skin secretions of the frogs *Litoria caerulea* and *Cyclorana australis*. *Australian Journal of Zoology* 45:13–20.

Cowles, R.B. (1940). Additional implications of reptilian sensitivity to high temperatures. *American Naturalist* 74:542–61.

Cowles, R.B. & Bogert, C.M. (1944). A preliminary study of the thermal requirements of desert reptiles. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 83:261–96.

Drewes, R.C., Hillman, S.S., Putnam, R.W. & Sokol, O.M. (1977). Water, nitrogen and ion balance in the African treefrog *Chiromantis petersi* (Rhacophoridae): structure of the integument. *Journal of Comparative Physiology* 116: 257–267.

Eterovick, P.A. & Sazima, I. (2004). Anfíbios da Serra do Cipó, Minas Gerais – Brasil. Belo Horizonte: PUC Minas.

Hillman, S.S., Withers, P.C., Drewes, R.C. & Hillyard, S.D. (2009). Ecological and environmental physiology of amphibians. New York: Oxford University Press.

Hillyard, S.D., Hoff, K.S. & Propper, C. (1998). The water absorption response: a behavioral assay for physiological processes in terrestrial amphibians. *Physiological Zoology* 71:127–138.

Hoppe, D.M. (1979). The influence of color on behavioral thermoregulation and hydoregulation. In: Burt, E.H. (Ed.). *The behavioral significance of color*, pp. 37–62. New York: Garland STPM Press.

Hutchinson, V.H. & Maness, J.D. (1979). The role of behavior in temperature acclimation and tolerance in ectotherms. *American Zoologist* 19:367–84.

Jameson, D.L. (1966). Rate of weight loss of tree frogs at various temperatures and humidities. *Ecology* 47:605–13.

Jared, C., Antoniazzi, M.M., Navas, C.A., Katchburian, E., Freymüller, E., Tambourgi, D.V. & Rodrigues, M.T. (2005). Head co-ossification, phragmosis and defence in the casque-headed tree frog *Corythomantis greeningi*. *Journal of Zoology* 265:1–8.

Junqueira, L.C.U. (1995). Histology revisited. Technical improvement promoted by the use of hydrophilic resin embedding. *Ciencia e Cultura (Sao Paulo)* 47:92–95.

Karnovsky, M.J.A. (1965). A formaldehyde glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 27:137.

- King, R.B., Hauff, S. & Phillips, J.B. (1994). Physiological color change in the green treefrog: responses to background brightness and temperature. *Copeia* 422–432.
- Kobelt, F. & Linsenmair, K.E. (1986). Adaptations of the reed frog *Hyperolius viridiflavus* (Amphibia, Anura, Hyperoliidae) to its arid environment. 1. The skin of *Hyperolius viridiflavus nitidulus* in wet and dry season conditions. *Oecologia* 68:533–541.
- Köppen, W. (1900). Versuch einer Klassifikation der Klimate, vorzugsweise nach ihren Beziehungen zur Pflanzenwelt. *Geographische Zeitschrift* 6(11):593–611.
- Lillywhite, H.B. (1970). Behavioural temperature regulation in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Copeia* 1:158–168.
- Lillywhite, H.B. (1971). Temperature selection by the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 40:213–27.
- Lillywhite, H.B., Licht, P. & Chelgren, P. (1973). The role of behavioral thermoregulation in the growth energetics of the toad, *Bufo boreas*. *Ecology* 54:375–383.
- Lillywhite, H.B. & Maderson, P.F.A. (1988). Structure and permeability of integument. *American Zoologist* 28:945–962.
- Lillywhite, H.B., Mittal, A.K., Garg, T.K. & Agrawal, N. (1997). Wiping behavior and its ecophysiological significance in the Indian Tree Frog *Polypedates maculatus*. *Copeia* 1:88–100.
- McClanahan Jr, L. & Baldwin R. (1969). Rate of water uptake through the integument of the desert toad, *Bufo punctatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 28:381–389.
- McClanahan, L.L., Stinner, J.W. & Shoemaker, V.H. (1978). Skin lipids, water loss and energy metabolism in a South American tree frog (*Phyllomedusa sauvagei*). *Physiological Zoology* 51(2):179–187.
- Muths, E. & Corn, P.S. (1997). Basking by adult boreal toads (*Bufo boreas boreas*) during the breeding season. *Journal of Herpetology* 31:426–28.
- Navas, C.A., Antoniazzi, M.M. & Jared, C. (2004). A preliminary assessment of anuran physiological and morphological adaptation to the Caatinga, a Brazilian semiarid environment. In: Morris, S. & Vosloo, A. (Ed.), *Animals and Environments. Proceedings of the Third International Conference of Comparative Physiology and Biochemistry*, vol. 1275, pp. 298–305. Cambridge: Elsevier.
- Roth, J.J. (1973). Vascular supply to the ventral pelvic region of anurans as related to water balance. *Journal of Morphology* 140(4):443–460.

Sazima, I. & Bokermann, W.C.A. (1977). Anfíbios da Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil. 3, Observações sobre a biologia de *Hyla alvarengai* Bok. (Anura, Hylidae). Revista Brasileira de Biologia 37:413–417.

Schmid, W.D. & Barden, R.E. (1965). Water permeability and lipid content of amphibian skin. Comparative Biochemistry and Physiology A 15:423–427.

Schmuck, R., Kobelt, F. & Linsenmair, K.E. (1988). Adaptations of the reed frog *Hyperolius viridiflavus* (Amphibia: Anura: Hyperoliidae) to its arid environment: V. Iridophores and nitrogen metabolism. Journal of Comparative Physiology B 158:537–546.

Shoemaker, V.H., Hillman, S.S., Hillyard, S.D., Jackson, D.C., McClanahan, L.L., Withers, P.C. & Wygoda, M.L. (1992). Exchange of water, ions, and respiratory gases in terrestrial amphibians. In: Feder, M.E. & Burggren, W.W. (Ed.). Environmental Physiology of the Amphibians, pp. 125–150. Chicago: The University of Chicago Press.

Stegen, J.C., Gienger, C.M. & Sun, L. (2004). The control of color change in the pacific tree frog, *Hyla regilla*. Canadian Journal of Zoology 82:889–896.

Tattersall, G.J., Eterovick, P.C. & Andrade, D.V. (2006). Tribute to R. G. Boutilier: Skin colour and body temperature changes in basking *Bokermannohyla alvarengai* (Bokermann 1956). Journal of Experimental Biology 209:1185–1196.

Toledo, R.C. & Jared, C. (1993). Cutaneous adaptations to water balance in amphibians. Comparative Biochemistry and Physiology A 105:593–608.

Toledo, R.C. & Jared, C. (1993b). The calcified dermal layer in anurans. Comparative Biochemistry and Physiology A 104:443–448.

Tracy, C.R., Christian, K.A., O'Connor, M.P. & Tracy, C.R. (1993). Behavioral thermoregulation by *Bufo americanus*: the importance of the hydric environment. Herpetologica 375–382.

Vences, M., Galán, P., Vieites, D.R., Puente, M., Oetter, K. & Wanke, S. (2002). Field body temperatures and heating rates in a montane frog population: the importance of black dorsal pattern for thermoregulation. Annales Zoologici Fennici 39:209–220.

Warburg, M.R., Rosenberg, M., Roberts, J.R. & Heatwole, H. (2000). Cutaneous glands in the Australian hylid *Litoria caerulea* (Amphibia, Hylidae). Anatomy and embryology 201(5):341–348.

Wells, K.D. (2007). The ecology and behavior of amphibians. Chicago: University of Chicago Press.

Withers, P.C. (1995). Evaporative water loss and colour change in the Australian desert tree frog *Litoria rubella* (Amphibia: Hylidae). Records of the Western Australian Museum 17:277–281.

Withers, P.C., Hillman, S.S., Drewes, R.C. & Sokol, O.M. (1982). Water loss and nitrogen excretion in sharp nosed reed frogs (*Hyperolius nasutus* – Anura, Hyperoliidae). *Journal of Experimental Biology* 97:335–343.

Wygoda, M.L. (1984). Low cutaneous evaporative water loss in arboreal frogs. *Physiological Zoology* 329–337.

Wygoda, M.L., Garman, R.H. & Howard, C.E. (1987). Cutaneous and subcutaneous adipose tissue in anuran amphibians. *Copeia* 1031–1035.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Bokermannohyla alvarengai é uma perereca rupícola que se destaca dentre os anfíbios anuros por apresentar características peculiares únicas que permitem explorar de forma sublime o ambiente que ocupa, os campos rupestres. Dois são os pontos fundamentais que devem ser considerados na história de vida da espécie. Primeiramente, devemos considerar que campos rupestres é uma fitofisionomia do Cerrado que ocorre acima de 1000 m de altitude classificada como um ambiente tipicamente xérico e, se pensarmos nos requerimentos dos anfíbios de um modo geral (sensibilidade fisiológica e dependência da água para reprodução), poderia se comportar como inadequado para o estabelecimento de populações. Adicionalmente, *B. alvarengai* apresenta comportamento de assoalhar, onde os animais permanecem em repouso por longos períodos do dia completamente expostos à radiação solar, podendo inclusive ocorrer em locais distantes de corpos d'água. O assoalhamento em anfíbios, porém, é problemático pois a alta permeabilidade do tegumento não representa uma barreira significativa para a perda de água por evaporação inerente ao comportamento, ou seja, durante a exposição ao sol os animais incorreriam no risco potencial de desidratação. Isto é especialmente arriscado em se tratando de assoalhamento em ambientes nos quais a disponibilidade de água é baixa ou efêmera, como é o caso dos campos rupestres. Assim, a termorregulação por meio do comportamento de assoalhar em anfíbios, principalmente em condições climáticas adversas, representa um desafio para os organismos sob a perspectiva fisiológica.

O assoalhamento em *B. alvarengai* pode ser observado ao longo de todo o ano em afloramentos rochosos, os quais conferem aos animais excelente camuflagem contra a coloração de fundo. Geralmente, assoalham na face leste das rochas onde há maior incidência direta dos raios solares e, nesta condição, são capazes de elevar a temperatura corpórea de acordo com a intensidade de radiação disponível ao longo do ciclo circadiano. Este mecanismo termorregulatório se mostra bastante eficiente na espécie e os benefícios do assoalhamento podem então ser atingidos sem que haja perda excessiva de água por evaporação. De fato, *B. alvarengai* exhibe incontestável capacidade de lidar com os problemas decorrentes da exposição solar apresentando um complexo mecanismo de regulação térmica e hídrica que possibilita esse comportamento, especialmente considerando-se as características particulares do ambiente que ocupa. E, neste caso, a evolução de especializações comportamentais, fisiológicas e morfológicas na espécie é que dão suporte ao assoalhamento em locais distantes de água livre, sob elevada temperatura e incidência de radiação solar.

Além de assoalhar em postura de conservação de água, ajuste postural onde os indivíduos protegem a superfície ventral (a qual é qualificada como a mais permeável) pressionando-a contra o substrato e selando o corpo com os membros, *B. alvarengai* apresenta marcante mudança fisiológica de cor a qual atua na modulação de troca de calor entre o animal e o ambiente. Este mecanismo, de fato, parece ser crucial já que permite fino ajuste do ganho de calor durante o assoalhamento na espécie. Por exemplo, a exposição ao sol provê aos animais o meio para elevar a temperatura corpórea através da absorção da energia radiante incidente e, com a continuidade da exposição, o controle da temperatura corpórea é facilitado pelo clareamento da pele aumentando o grau de reflexão da energia solar e prevenindo o superaquecimento devido ao resfriamento evaporativo. Contudo, a capacidade de alterar a coloração da pele em *B. alvarengai* como resposta ao assoalhamento só é possibilitada devido à presença de adaptações morfológicas na pele com uma complexa organização das células pigmentares. Além disso, o tegumento de *B. alvarengai* apresenta outras características morfofuncionais com implicações termo e osmorregulatórias como produção de muco e secreção lipídica na pele, a qual parece estar envolvida na redução da permeabilidade do tegumento retornando taxas de perda evaporativa de água relativamente baixas. Ademais, a hipervascularização e a presença marcante de verrugas por toda a superfície ventral também favorecem a economia de água possibilitando taxas de absorção a partir de água livre consideravelmente elevadas, principalmente através da mancha pélvica. Ou seja, estas adaptações morfo/fisiológicas, em conjunto, permitem o uso eficiente do assoalhamento como uma estratégia de termorregulação sem comprometer a manutenção de um equilíbrio hídrico adequado na espécie.

O comportamento de assoalhar em anfíbios, apesar de incomum, é reputado pelos inúmeros benefícios termorregulatórios podendo ser particularmente relevante em espécies que habitam regiões de altitude, já que a diminuição da temperatura ambiente média é acompanhada por altos níveis de radiação solar. *Bokermannohyla alvarengai* é encontrada nos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço em altitudes relativamente moderadas (~1.000 a 2.000 m), onde variações extremas de temperatura com dias quentes e noites frias são frequentes. Assim, tanto pela maior exposição à radiação solar como grande amplitude térmica diária, o compromisso entre termo e osmorregulação deve ter favorecido o aparecimento do comportamento de assolhar em *B. alvarengai*, proporcionando aos animais temperaturas corpóreas mais vantajosas durante a exposição. Além de prover vantagens como aceleração da digestão, crescimento e de processos reprodutivos e síntese de vitamina D, a elevação da temperatura corpórea com a exposição ao sol pode combater doenças e infecções podendo ser

fator chave, inclusive, na prevenção de surtos da quitridiomycose causada pelo fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*). Sabe-se que a prevalência e a intensidade de infecção do *Bd* são maiores em elevadas altitudes onde as condições ambientais para o desenvolvimento do fungo são mais favoráveis. Ou seja, a susceptibilidade à contaminação pela doença é mais acentuada em zonas de maior altitude aumentando, assim, a vulnerabilidade destes animais à declínios populacionais e extinções locais. Porém, no caso de *B. alvarengai*, os animais poderiam ser capazes de evitar ou reduzir a gravidade da infecção através do assoalhamento com a elevação da temperatura corpórea acima dos limites suportados pelo fungo.

Anfíbios são caracterizados por serem particularmente sensíveis a variações ambientais em função de seus requerimentos ecológicos e fisiológicos, o que resulta em alta susceptibilidade tanto à qualidade do ambiente como alterações no microclima. De fato, diversos declínios populacionais de anfíbios já foram associados a mudanças climáticas evidenciando que o aquecimento do planeta é uma ameaça sem precedentes para o grupo. Em se tratando de espécies de altitude, este quadro é ainda mais dramático considerando que estes animais são especialmente vulneráveis a sofrer completa perda de ambiente para a manutenção de suas atividades normais, principalmente espécies habitat-especialistas. Além dos problemas associados à disponibilidade e qualidade de corpos d'água, esta resposta parece estar relacionada com as limitações fisiológicas dos anuros que, apesar de sujeitos a grandes variações de temperatura diária em altitudes elevadas, podem não suportar o incremento na temperatura por períodos prolongados, que pode chegar até 4°C até o final do século em um cenário mais extremo. Ou seja, as mudanças nas condições climáticas que devem ocorrer nas próximas décadas, podem ser fatais para a manutenção das populações de anfíbios de altitude. Todavia, será que, assim como no combate ao fungo quitrídio, essa plasticidade fisiológica de *B. alvarengai* poderia beneficiar os animais frente ao aquecimento global? Pouco se conhece a respeito do papel das limitações fisiológicas nas consequências biológicas das mudanças climáticas, dificultando, assim, avaliar o papel do assoalhamento em anuros diante deste fenômeno. Este quadro salienta a necessidade de estudos sobre as tolerâncias térmicas das espécies assim como estudos que visem a compreensão do funcionamento da termorregulação em anfíbios. Somente a partir deste conhecimento é possível, juntamente com as informações ecológicas, elaborar previsões e mitigar os impactos das mudanças climáticas sobre a taxocenose por meio de planejamento e implementação de medidas de conservação eficazes.

ANEXOS

ANNEX 1**Courtship behavior of *Bokermannohyla alvarengai*, a waltzing anuran**

Fernanda C. Centeno, Paulo D. P. Pinheiro, and Denis V. Andrade

Artigo submetido para publicação no periódico Herpetological Review

Courtship Behavior of *Bokermannohyla alvarengai*, a Waltzing Anuran

FERNANDA C. CENTENO*, PAULO D. P. PINHEIRO, AND DENIS V. ANDRADE

Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, São Paulo, Brazil

* *Corresponding author*. E-mail: fccenteno@yahoo.com.br

Courtship in anurans may be very unpredictable, which renders it considerably difficult to observe and, as a consequence, we lack this kind of information for the majority of the currently recognized species. That is the case for the genus *Bokermannohyla* Faivovich, Haddad, Garcia, Frost, Campbell and Wheeler 2005, which is composed of 33 species (Frost 2013), but whose information on courtship behavior is limited to one species, *B. ibitiguara* (Cardoso 1983) (Nali and Prado 2012).

Bokermannohyla is a genus included in the tribe Cophomantini, with *Aplastodiscus*, *Hyloscirtus*, *Hypsiboas*, and *Myersiohyla*. Among these there are no records on literature about courtship behavior in *Hyloscirtus* and *Myersiohyla*; there is some information for *Hypsiboas* (Hödl 1977; Kluge 1981; Martins and Haddad 1988; Menin et al 2004; Camurugi and Juncá 2013; Landestoy 2013); and *Aplastodiscus* is the better known (Haddad and Sawaya 2000; Hartmann et al. 2004; Haddad et al. 2005; Carvalho Jr. et al. 2006; Zina and Haddad 2007). Herein, we provide information about the courtship behavior of *Bokermannohyla alvarengai* (Bokermann 1956) in attempt to contribute to the void on this behavioral trait within this poorly known, to this regard, clade.

Bokermannohyla alvarengai is a large treefrog inhabiting rocky meadows at elevations above 1000 m in southeastern Brazil. Its natural history is poorly understood,

including the reproductive biology, with most of the information available based on a few fragmented reports (e.g. Sazima and Bokermann 1977; Eterovick and Sazima 2000; Eterovick and Sazima 2004). This frog breeds in temporary streams with rocky bottom running on the low and sparse vegetation typical of its altitude habitat. As previously reported by Sazima and Bokermann (1977), *B. alvarengai* is a skittish species ceasing all its activities at the slightest disturbance, making it difficult to observe its courtship and mating behavior.

We were able to observe part of the courtship behavior of *B. alvarengai* under natural conditions at Serra do Cipó (19.290783°S, 43.582400°W, SAD69; 1196 m elev.), Minas Gerais state, Brazil. The courtship is described based on only one observation of a couple in the rainy season on the night of 17 November 2012. The reproductive event lasted about four hours from 2040 h to 0030 h. We used low illumination to minimize disturbance of the frogs. The male was 88.7 mm in SVL (snout-vent length) and the female, smaller than male, could not be measured since she escaped at the end of the observation. Air temperature was 19.2°C, relative humidity was 75.6%, and wind speed varied from 0.4 to 1 m/s.

The courtship behavior of *Bokermannohyla alvarengai* differed markedly from its congeneric species *B. ibitiguara*, as well as from the other species of Cophomantini. The most striking difference was observed after the more trivial behaviors, such as acoustic, visual, and tactile interaction, when the couple exhibited a unique and previously unreported sequence of complex waltz-like movements in the water. The stages with the sequential progress of the courtship behavior of *B. alvarengai* are described as follows (Fig. 1).

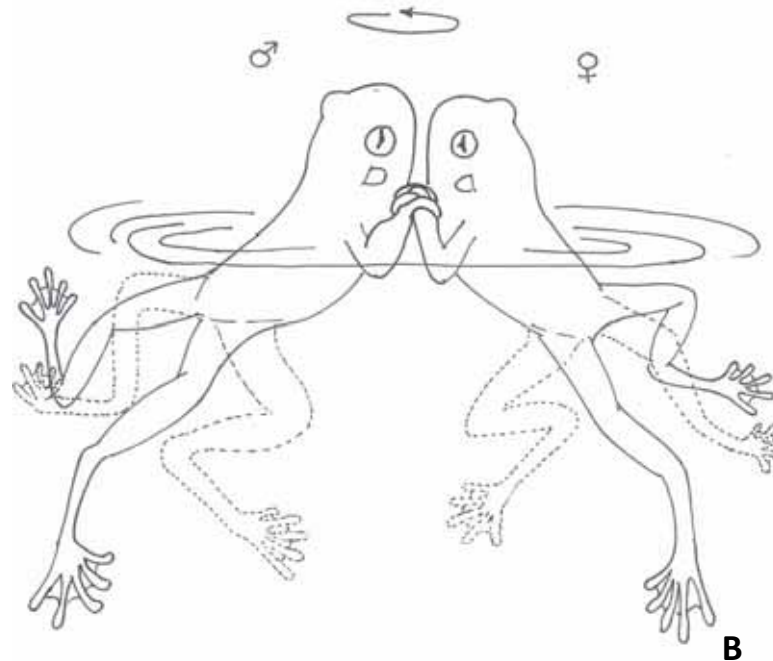


FIG. 1. Courtship in the treefrog *Bokermannohyla alvarengai*. (a) female approaches a calling male, leaps to his direction and bounces off the wall, returns to the ground, and moves to the same wall; (b) female and male in the puddle with holding hands and toes interlaced in a clasp touching and bumping their chest, and whirling the puddle by treading water using hind legs.

The male was in a small cavity at a vertical earthen wall (ca. 1 m from the ground) eroded by water on the stream edge, facing the watercourse. He was 1.5 m distant from a small shallow puddle (ca. 0.9 x 1.2 m width) surrounded by stones and vegetation, disconnected from the stream by the decrease of water level. Courtship began at 2040 h with the approach of a female into the male's territory. When first sighted, the female was sitting in a small rock near the ground in front of him, about 1.2 m of distance. Ten minutes later, she turned toward him and leapt to his direction, bounced off the earthen wall, and returned to the ground. After a while, the female moved to the same wall remaining 0.5 m below the male in the diagonal. The male started calling 20 min after the beginning of observation at 2100 h, and kept calling with long intervals between calls until 2325 h. At 2325 h both were observed inside the puddle facing each other with holding hands and toes interlaced, in a clasp touching and repeatedly bumping their chests. As we did not kept the lights on all the time (between 2040 h and 2325 h), we lost the information about which gender led the partner to the oviposition site, even as if there was a kind of signaling on this step. The couple then moved around the puddle using their hind legs to sustain the body describing circular movements, like dancing a waltz. After, they separated and the female submerged 0.2 m deep and the male hid himself under a clump of grass on the opposite edge of the puddle. The male resumed calling and within a few minutes, the female emerged and followed him to the clump. Both got out the grass clump and moved back to the centre of the puddle where they resumed the waltz-like movements circling for all over the puddle. Next, the male vigorously took the female and tried to lead her down water with his hypertrophied forearms, maintaining the female briefly belly-up, which was in our interpretation, an amplexus attempt. At this moment, the female escaped and shifted to the puddle edge and slowly moved away by the stream. The male chased her to the edge of the puddle and resumed calling, while watching the female, who apparently ignored his calls and left. The female entered into a crevice of a

rock and disappeared while the male continued to call far apart in time. The entire action into the water lasted 20 min after the initial physical contact (at 2325 h).

Despite the courtship behavior just described concluded with an unsuccessful attempt of amplexus, we believe that the behavioral sequence observed is a valid description of the pre-mating courtship behavior of *Bokermannohyla alvarengai*. As this species presents the reproductive mode number 2 laying its eggs in lotic water (Haddad and Prado 2005), it is quite likely that the eggs deposition would occur in that site. Furthermore, records about clutches in the same study area confirm this kind of oviposition site as preferred by the species (Centeno, pers. obs.).

The courtship of *B. alvarengai* seems to be essentially distinct of other species of Cophomantini. In *B. ibitiguara*, the courtship is more aggressive than noticed for *B. alvarengai*, with the male hitting the female with his arm to conduct her to the oviposition site (Nali and Prado 2012). In *Aplastodiscus*, the couple exchange many soft touches with chin, hands, and feet while the male conducts the female to the nest built by him (Haddad and Sawaya 2000; Hartmann et al. 2004; Haddad et al. 2005; Carvalho Jr. et al. 2006; Zina and Haddad 2007). The genus *Hypsiboas* presents a more variable array of courtship behaviors and, depending on species, the sequential progress could be more or less elaborated. In general, the vocalization is the first step to attract females and could be followed by a direct jump by the male, followed by the amplexus (e.g. *H. goianus*; Menin et al. 2004) or by a kind of visual or tactile signalization by the female indicating her receptiveness for mating (Hödl 1977; Kluge 1981; Martins and Haddad 1988; Camurugi and Juncá 2013; Landestoy 2013). Despite variations in the courtship behavior within the Cophomantini, none of them exhibit the complex waltz-like interaction herein reported for *B. alvarengai*. However, since our report corresponds to the second available for the genus, other congeneric species may share this same feature.

Acknowledgments: We are grateful to Parque Nacional da Serra do Cipó (PNSC) for research support, and Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) for collect permit (22170-3). This research was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, grants 2009/15712-0 and 2010/05473-6). We would like to thank Luke Easton for the courtship drawing, Julián Faivovich for providing valuable comments on the manuscript, and Jay Iwasaki for English revision.

Literature Cited

- Camurugi, F., and F. Juncá. 2013. Reproductive biology of *Hypsiboas atlanticus* (Anura: Hylidae). *Herpetol. Notes* 6:489–495.
- Carvalho Jr., R.R., C.A.B. Galdino, and L.B. Nascimento. 2006. Notes on the courtship behavior of *Aplastodiscus arildae* (Cruz & Peixoto, 1985) at an urban forest fragment in southeastern Brazil (Amphibia, Anura, Hylidae). *Arq. Mus. Nac. Rio Janeiro* 64:247–254.
- Eterovick, P.A., and I. Sazima. 2000. Structure of an anuran community in a montane meadow in southeastern Brazil: effects of seasonality, habitat, and predation. *Amphibia-Reptilia* 21:439–461.
- Eterovick, P.A., and I. Sazima. 2004. *Anfíbios da Serra do Cipó - Minas Gerais, Brasil*. 1st ed. Editora PUC Minas, Belo Horizonte, Minas Gerais. 151 pp.
- Frost, D.R. 2013. *Amphibian Species of the World: an Online Reference*. Ver. 5.6. Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York; accessed 10 Jan 2014.
- Haddad, C.F.B., and R.J. Sawaya. 2000. Reproductive modes of Atlantic forest hylid frogs: a general overview and the description of a new mode. *Biotropica* 32:862–871.
- Haddad, C.F.B., J. Faivovich, and P.C.A. Garcia. 2005. The specialized reproductive mode of the treefrog *Aplastodiscus perviridis* (Anura: Hylidae). *Amphibia-Reptilia* 26:87–92.
- Haddad, C.F.B., and C.P.A. Prado. 2005. Reproductive modes in frogs and their unexpected diversity in the Atlantic Forest of Brazil. *BioScience* 55:207–217.
- Hartmann, M.T., P.A. Hartmann, and C.F.B. Haddad. 2004. Visual signaling and reproductive biology in a nocturnal treefrog genus *Hyla* (Anura: Hylidae). *Amphibia-Reptilia* 25:395–406.
- Hödl, W. 1977. Call differences and calling site segregation in anuran species from central Amazonian floating meadows. *Oecologia* 28:351–363.

Kluge, A. 1981. The life history, social organization, and parental behavior of *Hyla rosenbergi* Boulenger, a nest-building gladiator frog. Misc. Publ. Mus. Zool. Univ. Mich. 160:1–170.

Landestoy, M.A. 2013. Observations on the breeding behavior of the Hispaniolan green treefrog, *Hypsiboas heilprini*. IRFC Reptiles & Amphibians 20:160–165.

Martins, M., and C.F.B. Haddad. 1988. Vocalizations and reproductive behaviour in the smith frog, *Hyla faber* Wied (Amphibia: Hylidae). Amphibia-Reptilia 9:49–60.

Menin, M., R.A. Silva, and A.A. Giaretta. 2004. Reproductive biology of *Hyla goiana* (Anura, Hylidae). Iheringia Ser. Zool. 94:49–52.

Nali, R.C., and C.P.A. Prado. 2012. Habitat use, reproductive traits and social interactions in a stream-dweller treefrog endemic to the Brazilian Cerrado. Amphibia-Reptilia 33:337–347.

Sazima, I., and W.C.A. Bokermann. 1977. Anfíbios da Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil. 3: Observações sobre a biologia de *Hyla alvarengai* Bok. (Anura, Hylidae). Rev. Bras. Biol. 37:413–417.

Zina, J., and C.F.B. Haddad. 2007. Courtship behavior of two treefrog species, *Aplastodiscus arildae* and *A. leucopygius* (Anura: Hylidae), from the Atlantic Rainforest, southeastern Brazil. Herpetol. Rev. 38:282–284.

APPENDIX 2

Updated distribution map of *Acratosaura mentalis* (Squamata, Gymnophthalmidae): a prey species of the treefrog *Bokermannohyla alvarengai* (Anura, Hylidae)

Fernanda C. Centeno, Mauro Teixeira Junior, Renato Recoder, Denis V. Andrade and Miguel Trefaut Rodrigues

Artigo submetido para publicação no periódico Herpetology Notes

Updated distribution map of *Acratosaura mentalis* (Squamata, Gymnophthalmidae): a prey species of the treefrog *Bokermannohyla alvarengai* (Anura, Hylidae)

Fernanda C. Centeno¹*, Mauro Teixeira Junior², Renato Recoder², Denis V. Andrade¹ and Miguel Trefaut Rodrigues²

¹Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, São Paulo, Brazil

²Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil

*corresponding author: fefacenteno@gmail.com

The family Gymnophthalmidae is represented by about 240 species occurring across South and Central America (Uetz and Hošek, 2014). *Acratosaura mentalis* (Amaral 1933), a small species reaching up to 59 mm snout-vent length (SVL; Rodrigues et al., 2009), was originally described as *Colobosaura mentalis*, from Vila Nova (today known as Senhor do Bonfim), Bahia state (BA), north-eastern Brazil. Molecular analyses revealed that the species belonged to a distinct lineage and the genus *Acratosaura* was raised to accommodate it (Rodrigues et al., 2007). Two years later another species was added to *Acratosaura*, *A. spinosa* Rodrigues, Cassimiro, Freitas and Silva 2009, which was discovered in Serra do Sincorá, Chapada Diamantina (BA) (Rodrigues et al., 2009).

Although described in the early 20th century, *Acratosaura mentalis* is still rare in scientific collections and its natural history remains poorly known, apart from sporadic comments on its occurrence (Rodrigues, 2003; Delfim and Freire, 2007; De-Carvalho et al., 2010), leading originally to the conclusion that it had a relictual distribution (Rodrigues, 2003). Recently obtained specimens now provide evidence of a widespread distribution throughout north-eastern Brazil to the south of the Espinhaço mountain range (Rodrigues et al., 2009; De-Carvalho et al., 2010; Brito et al., 2012). Herein we present an updated map of its distribution with new records, and report on a predation event of this lizard by the treefrog *Bokermannohyla alvarengai* (Bokermann 1956).

The new records were gathered from recent collected specimens (MTR, field number of Miguel Trefaut Rodrigues, housed at the herpetological collection of Laboratório de Herpetologia da

Universidade de São Paulo; AAGARDA, field number of Adrian Garda, housed at the herpetological collection of Laboratório de Anfíbios e Répteis da Universidade Federal do Rio Grande do Norte), museum collections (CTMZ, Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo; MNRJ, Museu Nacional do Rio de Janeiro; MUFAL; Museu da Universidade Federal de Alagoas), and online databases (MCZ, Museum of Comparative Zoology [<http://mczbase.mcz.harvard.edu/guid/MCZ:Herp:R-59266>]) (Table 1).

These records fill geographical gaps within the formerly known distribution of *A. mentalis* (Amaral, 1932; Queiroz and Lema, 1996; Arzabe et al., 2005; Rodrigues et al., 2005; Delfim and Freire, 2007; Rodrigues and Dos Santos, 2008; Santos et al., 2008; Silva, 2008; Rodrigues et al., 2009; De-Carvalho et al., 2010; Gogliath et al., 2010; Brito et al., 2012; Freitas et al., 2012; Garda et al., 2013; Souza et al., 2013), extending it towards the coast of north-eastern Brazil, and to the south in Minas Gerais state (MG) (Figure 1).

One record is based on the remains of a specimen (Figure 2) found in the stomach of *Bokermannohyla alvarengai* from Serra do Cipó (MG), which now stands as the southernmost record of *A. mentalis* (-19.29188°, -43.59322°, SAD69; 1113 m a.s.l). On the 4th February 2012 at 20:30h, an adult male individual of *B. alvarengai* (72.87 mm SVL, 31.89 mm head width, 41.5 g body mass) was found active in a crevice of a rocky outcrop, 20 meters from a watercourse; its stomach contents were extracted via stomach-flushing (Solé et al., 2005). Air temperature was 23.7°C and relative humidity was 63%. The frog was released after stomach flushing in the field and the stomach contents were deposited in herpetological collection MTR (voucher MTR 21480). Lizard remains in the sample were confirmed as belonging to *A. mentalis* by morphological (three pairs of mentals, middorsal yellow stripe, and keeled scales on tail), and molecular data (R. Recoder unpubl. data).

Bokermannohyla alvarengai is a large treefrog with adult males reaching up to 140 mm SVL (Bokermann, 1956; Sazima and Bokermann, 1977; Lugli and Haddad, 2006). It is endemic of *campos rupestres* (rocky meadows), inhabiting the Espinhaço mountain range from Serra do Ouro Branco (MG) to southern Bahia (Bokermann, 1964; Eterovick and Sazima, 2004; São Pedro et al., 2008). Although the species is a generalist predator with a diet consisting of a wide array of prey types, this is the first record of predation on a vertebrate (F. Centeno unpubl. data).

Despite an essentially nocturnal habit, *B. alvarengai* is known for spending long periods basking in sunlight, sitting motionless and exposed on rock boulders (Sazima and Bokermann, 1977). On the other hand, *A. mentalis* is thought to be an essentially diurnal, semi-fossorial species inhabiting the leaf litter (Rodrigues, 2003). It is unclear whether the predation event occurred during day, night or twilight hours. However, *A. mentalis* can also be found in the open rocky meadow habitat of Espinhaço mountain range, perhaps increasing the chance for encounters between individuals of these two species.

This study extends the known distribution of *Acratosaura mentalis* and has provided direct evidence that *Bokermannohyla alvarengai* is a predator of this species. Whatever the predation scenario, this latter finding is also a testament to the usefulness of diet analysis in expanding our knowledge of prey species distributions. Further research into the natural history of both species is required if we are to elucidate the level of ecological interaction between them.

Acknowledgements

We wish to thank Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) for the collection permit (permit number 22170-3). We are very grateful to H. Zaher (MZUSP), A. Garda (UFRN), P. Passos (MNRJ), S. Torquato and T. Mott (UFAL) for access to tissues and specimens under their care. This research was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, grants 2009/15712-0 and 2010/05473-6). We would also like to thank Bastian Egeter for providing critical review of the manuscript and English revision.

References

- Amaral, A. (1933): Estudos sobre Lacertílios Neotrópicos I. Novos gêneros e espécies de lagartos do Brasil. *Memórias do Instituto Butantan* 7: 51-74.
- Arzabe, C., Skuk, G., Santana, G.G., Delfim, F.R., Lima, Y.C.C., Abrantes, S.H.F. (2005): Herpetofauna da área de Curimataú, Paraíba. In: *Análise das variações da biodiversidade do bioma caatinga: suporte a estratégias regionais de conservação*, p. 265-280. Araújo, F.S., Rodal, M.J.N., Barbosa, M.R.V., Ed., Brasília, Ministério do Meio Ambiente.
- Bokermann, W.C.A. (1956): Sobre uma nova espécie de *Hyla* do estado de Minas Gerais, Brasil (Amphibia, Salientia-Hylidae). *Papéis Avulsos de Zoologia* 12: 357-362.

Bokermann, W.C.A. (1964): Dos novas espécies de *Hyla* de Minas Gerais y notas sobre *Hyla alvarengai* Bok. (Amphibia, Salientia-Hylidae). *Herpetologica* **62**: 453-465.

Brito, M.S., Barbosa, L.F.S., Pereira, L.C., Nicola, P.A., Ribeiro, L.B. (2012): Range extension, new state record and geographic distribution map of *Acratosaura mentalis* (Amaral 1933) (Squamata: Gymnophthalmidae). *Check List* **8**: 172-174.

De-Carvalho, C.B., Caldas, F.L.S., Santana, D.O., Noronha, N.V., Freitas, E.B., Faria, R.G., Santos, R.A. (2010): Reptilia, Squamata, gymnophthalmidae, *Acratosaura mentalis* (Amaral 1933): distribution extension and geographic distribution map. *Check List* **6**: 434-436.

Delfim, F.R., Freire, E.M.X. (2007): Os lagartos gimnoftalmídeos (Squamata: Gymnophthalmidae) do cariri paraibano e do seridó do Rio Grande do Norte, Nordeste do Brasil: considerações acerca da distribuição geográfica e ecologia. *Oecologia Brasiliensis* **11**: 365-382.

Eterovick, P.C., Sazima, I. (2004): Anfíbios da Serra do Cipó, Minas Gerais - Brasil, Belo Horizonte, Editora PUC Minas.

Freitas, M.A., Veríssimo, D., Uhlig, V. (2012): Squamate Reptiles of the central Chapada Diamantina, with a focus on the municipality of Mucugê, state of Bahia, Brazil. *Check List* **8**: 16-22.

Garda, A.A., Costa, T.B., Santos-Silva, C., Mesquita, D.O., Faria, R.G., Conceição, B.M., Silva, I.R.S., Ferreira, A.S., Rocha, S.M., Palmeira, C.N.S., Rodrigues, R., Ferrari, S.F., Torquato, S. (2013): Herpetofauna of protected areas in the caatinga I: Raso da Catarina Ecological Station (Bahia, Brazil). *Check List* **9**: 405-414.

GBIF (2014): Global Biodiversity Information Facility - Data Portal. Available at: <http://data.gbif.org>. Last accessed on 31 July 2014.

Gogliath, M., Ribeiro, L.B., Freire, E.M.X. (2010): *Acratosaura mentalis* (ncn). *Herpetological Review* **41**: 105-106.

Lugli, L., Haddad, C.F.B. (2006): A new species of the *Bokermannohyla pseudopseudis* group from central Bahia, Brazil (Amphibia, Hylidae). *Herpetologica* **62**: 453-465.

Queiroz, A.N., Lema, T. (1996): Novo registro de *Colobosaura mentalis* Amaral 1933, (Sauria; Teiidae) para o nordeste do Brasil. *Biociências* **4**: 97-90.

Rodrigues, M.T. (2003): Herpetofauna da caatinga. In: *Ecologia e conservação da caatinga*, p. 181-236. Leal, I.R., Tabarelli, M., Silva, J.M.C., Ed., Recife, Universidade Federal de Pernambuco.

Rodrigues, M.T., Santos, E.M. (2008): A new genus and species of eyelid-less and limb reduced gymnophthalmid lizard from northeastern Brazil (Squamata, Gymnophthalmidae). *Zootaxa* **1873**: 50-60.

Rodrigues, M.T., Freire, E.M.X., Pellegrino, K.C.M., Sites, J.W. (2005): Phylogenetic relationships of a new genus and species of microteiid lizard from the Atlantic Forest of north-eastern Brazil (Squamata, Gymnophthalmidae). *Zoological Journal of the Linnean Society* **144**: 543-557.

Rodrigues, M.T., Pellegrino, H.C.M., Dixo, M., Verdade, V.K., Pavan, D., Argolo, A.J.S., Sites, J.W. (2007): A new genus of microteiid lizard from the atlantic forests of state of Bahia, Brazil, with a new generic name for *Colobosaura mentalis*, and a discussion of relationships among the Heterodactylini (Squamata, Gymnophthalmidae). *American Museum Novitates* **3565**: 1-27.

- Rodrigues, M.T., Cassimiro, J., Freitas, M.A., Silva, T.F.S. (2009): A new microteiid lizard of the genus *Acratosaura* (Squamata: Gymnophthalmidae) from Serra do Sincorá, state of Bahia, Brazil. *Zootaxa* **2013**: 17-29.
- Santos, F.J.M., Peña, A.P., Luz, V.L.F. (2008): Considerações biogeográficas sobre a herpetofauna do submédio e da foz do rio São Francisco, Brasil. *Estudos* **35**: 59-78.
- São Pedro, V.A., Drummond, L.O., Costa, H.C., Fernandes, V.D., Feio, R.N. (2008): Predação de embriões por girinos de *Bokermannohyla alvarengai* (Anura, Hylidae) em riacho temporário na Serra do Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil. *Boletim do Museu de Biologia Melo Leitão* **24**: 111-118.
- Sazima, I., Bokermann, W.C.A. (1977): Anfíbios da Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil. 3, observações sobre a biologia de *Hyla alvarengai* Bok. (Anura, Hylidae). *Revista Brasileira de Biologia* **37**: 413-417.
- Silva, U.G. (2008): Diversidade de espécies e ecologia da comunidade de lagartos de um fragmento de mata atlântica no nordeste do Brasil. Unpublished master's thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 90 pp.
- Solé, M., Beckmann, O., Pelz, B., Kwet, A., Engels, W. (2005): Stomach-flushing for diet analysis in anurans: an improved protocol evaluated in a case study in araucaria forests, southern Brazil. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* **40**: 23-28.
- Souza, K., Coelho, R.D.F., Sobrinho, C.P., Nascimento, J.P.B., Gogliath, M., Ribeiro, L.B. (2013): Fauna de lagartos de habitats de Caatinga do Campus Ciências Agrárias da Universidade Federal Do Vale Do São Francisco, Petrolina-Pe, Brasil. *Revista Brasileira de Zoociências* **15**: 253-265.
- Uetz, P., Hošek, J. (2014): *Acratosaura*, The reptile database. Available at: <http://reptile-database.reptarium.cz>. Last accessed on 16 August 2014.

Table 1. New records of *Acratosaura mentalis*. BA = Bahia, PE = Pernambuco, SE = Sergipe, MG = Minas Gerais. MTR = Herpetological collection of Laboratório de Herpetologia, Universidade de São Paulo, under the care of Miguel Trefaut Rodrigues; AAGARDA = Herpetological collection of Laboratório de Anfíbios e Répteis, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, under the care of Adrian Garda; CTMZ = tissue collection of Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo; MUFAL = Universidade Federal de Alagoas; MNRJ = Museu Nacional do Rio de Janeiro; MCZ = Museum of Comparative Zoology; Id = identification numbers (as presented in Figure 1).

Id	State	Locality	Latitude	Longitude	Precision	Source
1	MG	Alto da Boa Vista, Serra do Cipó	-19.29188	-43.59322	GPS	MTR 33388
2	MG	Jequitinhonha, Mata Escura	-16.32803	-40.95137	GPS	MTR 17419, 17265
3	BA	Brumado	-14.20058	-41.71664	GPS	CTMZ 13808
4	BA	Iramaia	-13.41898	-41.16113	City	MNRJ 24250
5	BA	Santa Maria da Vitória, Cuscuzeiro	-13.30295	-44.02181	GPS	MTR 27024
6	BA	Morro do Chapéu	-11.55000	-41.15000	GPS	MTR 22530
7	BA	Tucano	-11.16982	-38.83933	GPS	MTR 23256
8	AL	Traipu, Serra da Mão	-9.75277	-36.94638	Aprox.	MUFAL 9782, 9414
9	AL	Maceió, Bairro do Farol	-9.64951	-35.73257	Aprox.	MUFAL 10371
10	PE	João Alfredo	-7.86660	-35.58333	City	MCZ R-59266
11	RN	João Câmara	-5.53333	-35.80000	City	AAGARDA 5689-90

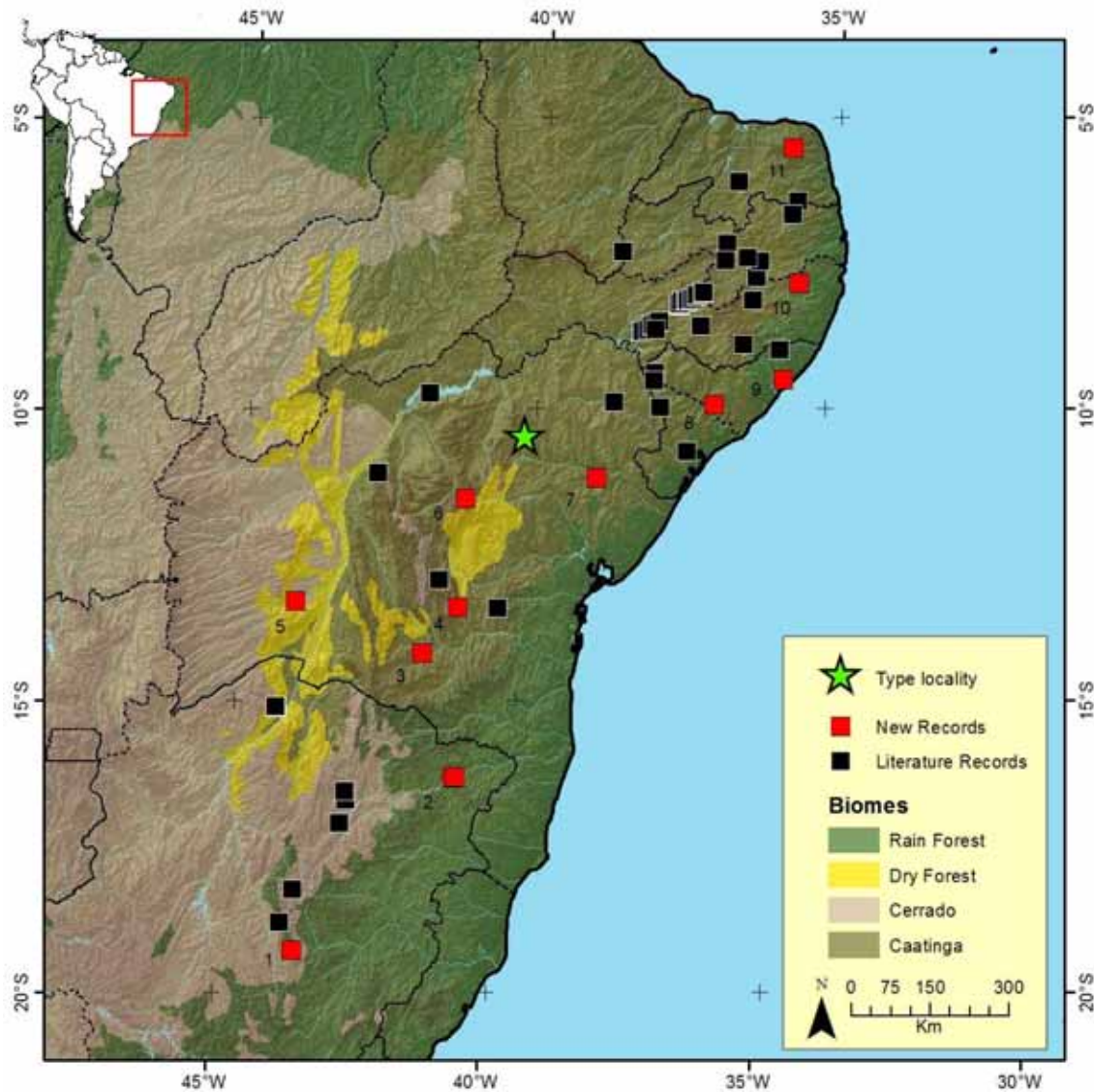


Figure 1. Distribution of *Acratosaura mentalis*: green star = type locality; red squares = new records; and black squares = literature records. Localities of the new records: 1. Serra do Cipó (location of *Bokermanohyla alvarengai* predation event), MG; 2. Jequitinhonha, MG; 3. Brumado, BA; 4. Iramaia, BA; 5. Santa Maria da Vitória, BA; 6. Morro do Chapéu, BA; 7. Tucano, BA; 8. Traipu, AL; 9. Maceió, AL; 10. João Alfredo, PE; 11. João Câmara, RN.

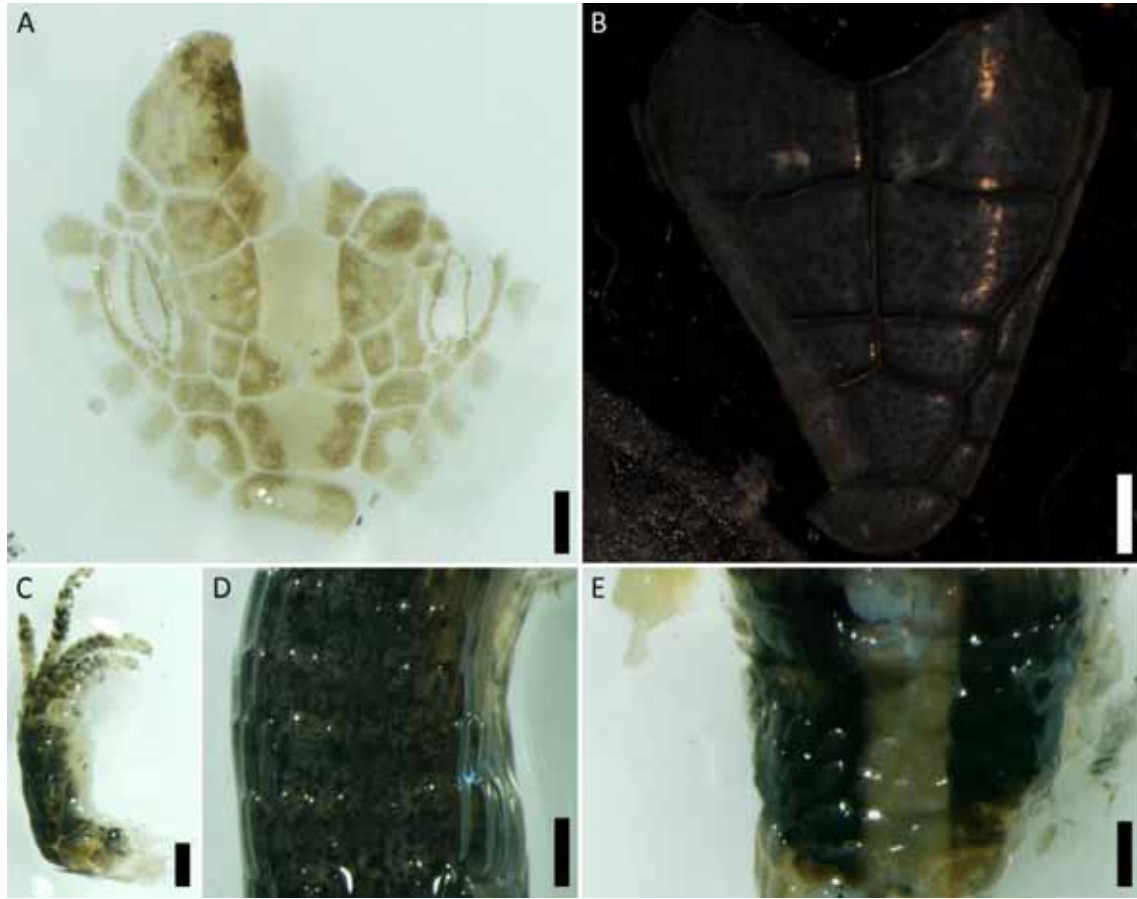


Figure 2. Remains of *Acratosaura mentalis* found in the stomach contents of *Bokermannohyla alvarengai* at Serra do Cipó (MG). **A.** head-shields; **B.** chin-shields; **C.** left forelimb; **D.** dorsal view of the tail; **E.** dorsal view of the neck. Bars = 1 mm.